

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI**  
**“FEDERICO II”**



**FACOLTA' DI AGRARIA**

*Dipartimento di Arboricoltura Botanica e Patologia Vegetale*

**Tesi di Dottorato di Ricerca in Agrobiologia agrochimica**  
**Indirizzo: Patologia vegetale**  
**XXIII ciclo**

**Miglioramento della produzione di composti  
biocidi in piante officinali**

**Tutor:**  
**prof. Astolfo Zoina**

**Candidato:**  
**dr. Francesco Campanile**

**Cotutors:**  
**dr. Massimo Zaccardelli**  
**prof. Antonio Evidente**

**Coordinatore:**  
**Prof. Matteo Lorito**

*Triennio 2008-2010*

*Al piccolo Ciro*

<b>INDICE</b>	<b>pag.</b>
<b><i>Capitolo 1                    Introduzione</i></b>	<b>1</b>
1.1.    Piante officinali: generalità	1
1.2.    Piante officinali nella storia	2
1.3. <i>Lamiaceae</i>	3
1.3.1. <i>Lamiaceae</i> : importanza e diffusione	4
1.3.2.    Timo	5
1.3.3.    Origano	6
1.4.    Metabolismo secondario	8
1.4.1.    Principali pathway biosintetici	9
1.5.    Oli essenziali e loro attività	12
1.5.1.    Olio essenziale di timo	14
1.5.2.    Olio essenziale di origano	16
1.6.    Fertilizzanti Innovativi per l'orticoltura sostenibile	17
1.6.1.    Il compost	18
1.6.2.    Le farine di disoleazione	20
1.7.    Batteri PGPR/ISR: generalità	21
1.7.1.    Meccanismi di azione	21
1.7.2.    Le principali specie batteriche coinvolte	25
1.7.3.    L'impiego dei PGPR/ISR in agricoltura	27
1.8    Scopo della tesi	28
 <b><i>Capitolo 2                    Materiali e metodi</i></b>	 <b>29</b>
2.1.    Prove in ambiente controllato	29
2.1.1.    Prova ammendanti	29
2.1.1.a    Allevamento delle piantine	29
2.1.1.b    Somministrazione degli ammendanti	30

2.1.2.	Prova con batteri PGPR/ISR	30
2.1.2.a	Allevamento delle piantine	30
2.1.2.b	Moltiplicazione e inoculazione dei batteri	31
2.1.3.	Rilievi bio-morfologici sulle piante	32
2.2.	Valutazione dell'attività ormono-simile dei ceppi	
	7III BAC e CEPPO 16	33
2.2.1.	Preparazione dei filtrati colturali	33
2.2.2.	Biosaggio per l'attività auxino-simile	33
2.3.	Prove in campo	34
2.3.1.	Prova ammendanti	34
2.3.1.a	Distribuzione degli ammendanti	34
2.3.2.	Prova con batteri PGPR/ISR	35
2.3.2.a.	Preparazione e distribuzione degli inoculi	36
2.4.	Rilievi eseguiti sulle piante	37
2.5.	Estrazione degli oli essenziali	37
2.6.	Analisi GC/MS degli oli essenziali	39
2.7.	Valutazione dell'attività biocida degli oli estratti	39
2.7.1.	Batteri e funghi fitopatogeni e loro condizioni di crescita	40
2.7.2.	Determinazione della Minimum Inhibitory Concentration (MIC)	41
2.8.	Elaborazione statistica dei dati	41
<b>Capitolo 3</b>	<b>Risultati</b>	<b>42</b>
3.1.	Prova ammendanti in ambiente controllato	42
3.1.1.	Rilievi biometrici su timo	42
3.1.2.	Resa in olio essenziale di timo	44
3.1.3.	Test di attività biocida dell'olio di timo	45
3.1.4.	Rilievi biometrici su origano	47
3.1.5.	Resa in olio essenziale di origano	49
3.1.6.	Test di attività biocida dell'olio di origano	49
3.2.	Prova PGPR in ambiente controllato	52

3.2.1.	Rilievi biometrici su timo	52
3.2.2.	Resa in olio essenziale di timo	55
3.2.3.	Test di attività biocida dell' olio di timo	55
3.2.4.	Rilievi biometrici su origano	58
3.2.5.	Resa in olio essenziale di origano	61
3.2.6.	Test di attività biocida dell' olio di origano	61
3.3.	Attività auxino-simile del CEPPO 16 e 7III BAC	64
3.4.	Prova ammendanti in pieno campo	64
3.4.1.	Rilievi biometrici su timo	64
3.4.2.	Resa in olio essenziale di timo	65
3.4.3.	Determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) dell'olio di timo	66
3.4.4.	Composizione chimica dell'olio essenziale di timo	68
3.5.	Prova PGPR/ISR in campo	70
3.5.1.	Rilievi biometrici su timo	70
3.5.2.	Resa in olio essenziale di timo	70
3.5.3.	Determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) dell'olio essenziale di timo	72
3.5.4.	Composizione chimica dell'olio essenziale di timo	72
<b>Capitolo 4</b>	<b>Discussioni</b>	<b>75</b>
<b>Capitolo 5</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>81</b>
<b>Capitolo 6</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>83</b>



## **Capitolo 1      Introduzione**

### **1.1.    Piante officinali: generalità**

Con il termine “officinali” si intende l’insieme di tutte quelle specie vegetali che, direttamente o tramite principi attivi estratti da esse, possiedono interesse medicinale o aromatico o cosmetico. A tale raggruppamento afferiscono sia le classiche specie aromatiche e medicinali, sia un gran numero di colture destinate alla preparazione di prodotti cosmetici, liquoristici, di condimenti, di sostanze coloranti, di oli essenziali, di ingredienti per l’industria alimentare nonché di prodotti per la difesa delle piante (AA.VV., 2009). Spesso le definizioni di “pianta aromatica” e “pianta medicinale” vengono incluse nell’unica accezione di “pianta officinale” (ISMEA, 1994). L’Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha puntualizzato il termine “*pianta medicinale*” assegnandola ad “*ogni vegetale che contiene sostanze che possono essere utilizzate per scopi terapeutici o preventivi, sotto forma di preparati semplici. Oppure, dopo averle isolate e modificate chimicamente, possono far parte di prodotti farmaceutici e quindi sono i precursori di sintesi chimico-farmaceutiche*”. Con questa definizione si è voluto rivalutare tutta una serie di piante, di norma conosciute con l’espressione di “piante della medicina popolare”, che costituivano fino a pochi decenni fa la base della scienza medica, spesso dimenticate con il successivo avvento dei farmaci di sintesi (De Maria, 1992). Tuttavia, negli ultimi anni, questo interesse sembra aver ripreso vigore poiché, secondo quanto riportato dall’OMS, più del 25% della popolazione nei paesi industrializzati e più dell’80% nei paesi in via di sviluppo, si cura con rimedi naturali (Canter *et al.*, 2005). Con la definizione di “pianta aromatica”, invece, vengono indicate quelle piante dotate di una o più sostanze che conferiscono particolari odori o sapori e che vengono impiegate nella preparazione di bevande, profumi, cosmetici e per condire alimenti.

## 1.2. Piante officinali nella storia

Le piante e le erbe officinali prendono il loro nome dalla parola latina “*officina*”, in riferimento agli antichi laboratori farmaceutici dove si procedeva all'estrazione di droghe tradizionalmente usate nella medicina popolare (AA.VV., 2001). Anche se le specie officinali sono state utilizzate, fin dall'antichità, per il loro profumo, sapore e per le proprietà conservanti (Bauer *et al.*, 2001), tra gli oli essenziali conosciuti solo l'olio di trementina è menzionato dagli storici greci e romani (Guenther, 1948).

La distillazione come metodo per estrarre gli oli essenziali (EO) viene introdotta per la prima volta in Oriente (Egitto, India e Persia) più di 2000 (Guenther, 1948) anni fa ed è stato migliorato nel IX secolo dagli arabi (Bauer *et al.*, 2001). Il primo scritto autentico riguardo la distillazione è attribuito ad Arnaldo de Villa Nova (ca. 1235-1311), alchimista catalano (Guenther, 1948). Dal XIII secolo gli oli essenziali venivano prodotti dalle farmacie e i loro effetti farmacologici furono descritti nei trattati di farmacopea (Bauer *et al.*, 2001), ma il loro uso non sembra essersi diffuso in Europa fino al XVI secolo. Da quel momento gli oli essenziali venivano scambiati e commercializzati nella città di Londra (Crosthwaite, 1998). Mediante pubblicazioni separate inerenti la distillazione e l'uso degli oli essenziali, due alchimisti del XVI secolo Brunschwig e Reiff, citano solo un numero relativamente piccolo di oli, tra questi quelli di trementina, legno di ginepro, rosmarino, lavanda, chiodi di garofano, noce moscata, anice e cannella (Guenther, 1948). Secondo il medico francese Du Chesne, nel XVII secolo la preparazione di EO era ben nota e le farmacie generalmente possedevano 15-20 oli diversi (Guenther, 1948). L'uso dell'olio dell'albero del tè per uso medico è stato documentato sin dall'inizio della colonizzazione dell'Australia fino alla fine del secolo XVIII, anche se è probabile che sia stato utilizzato, precedentemente, dai nativi australiani (Carson *et al.*, 1993).

I primi esperimenti riguardo proprietà battericide dei vapori di EO sono stati realizzati da De la Croix nel 1881 (Boyle, 1955). Tuttavia, nel corso dei secoli XIX e XX, l'uso degli oli essenziali in medicina a poco a poco è diventato secondario rispetto al loro utilizzo per insaporire e aromatizzare (Guenther, 1948).



### 1.3. *Lamiaceae*

Le piante officinali comprendono diverse famiglie tra le quali si annoverano le *Apiaceae*, le *Lamiaceae* e le *Verbenaceae*.

Con il nome di *Lamiaceae* o anche *Labiatae* si intende una vasta ed omogenea famiglia di dicotiledoni che comprende 200 generi e circa 3200 specie. Il carattere morfologico più evidente è dato dal lembo della corolla, incurvato sia all'interno che all'esterno a ricordare la forma di un labbro, da cui il nome di *Labiatae*.

Sono piante prevalentemente erbacee, annuali o perenni. In qualche raro caso alcune specie del genere *Hyptis* presentano un abito arboreo, mentre ancora più raro è l'aspetto lianoso per le poche specie del genere *Scutellaria*.

Il fusto e i rami sono a caratteristica sezione quadrangolare. Le foglie, prive di stipole, sono opposte o verticillate, semplici o pennato-sette o pennato-composte.

I fiori sono ermafroditi, zigomorfi, riuniti in infiorescenze che possono essere a spicastro (insieme di fiori inseriti all'ascella delle foglie disposte a corona sui nodi, molto ravvicinati che rassomigliano ad una spiga) oppure a verticillastro. La corolla, caratteristica, è bilabiata e si compone di 5 petali: 2 formano il labbro superiore e 3 quello inferiore. L'ovario è supero e quadriloculare. Lo stilo è ginobasico, lo stimma è generalmente bifido. I semi hanno scarso endosperma cellulare, spesso riassorbito durante lo sviluppo embrionale. L'impollinazione è quasi sempre entomogama e, nello specifico, è operata da ditteri ed imenotteri (AA.VV., 2004).

Le *Lamiaceae* vengono suddivise in otto sottofamiglie:

1. *Ajugoideae*, i cui principali generi sono *Ajuga*, *Teucrium* e *Rosmarinum*;
2. *Prostantheroideae*, i cui principali generi sono *Chloanthes*, *Cyanostegia*, *Hemiandra*
3. *Prasioideae*, rappresentata dai generi *Prasium* e *Gomphostemma*;
4. *Scutellarioideae*, nella quale sono compresi i generi *Salazaria*, *Scutellaria*, *Tinnea*
5. *Lavanduloideae*, rappresentata dal genere *lavandula*;
6. *Stachyoideae*, che raggruppa generi molto importanti quali *Melissa*, *Thymus*, *Mentha*, *Origanum*, *Satureja*, *Marrubium*, *Hyssopus*;

7. *Ocimoideae*, i cui principali generi sono *Ocimum*, presente nella nostra flora spontanea, *Coleus* e *Plectranthus*, propri di altre regioni;
8. *Cathopherioideae* (Cantino, 1992).

### 1.3.1. *Lamiaceae*: importanza e diffusione

Sebbene la loro distribuzione sia cosmopolita, le *Lamiaceae* sono molto più diffuse nell'areale mediterraneo, che rappresenta il principale centro di differenziazione della famiglia (Strasburger, 2007). Allo stato spontaneo, molte di esse prediligono habitat nemorali; tuttavia, la maggior parte preferisce ambienti aperti e soleggiati, entrando nella costituzione di macchie e garighe (*Salvia triloba*) pascoli aridi montani (*Stachys tymphaea*) o pascoli umidi (*Prunella vulgaris*) (Pignatti, 1982).

Alla base del loro ampio utilizzo vi è una caratteristica istologica che le accomuna: la presenza, lungo l'intera pianta, in particolare sul fusto e sulle foglie, di ghiandole e peli secretori contenenti oli essenziali (Cantino, 1990).

I peli sono fitti sui fusti e sui grossi nervi e sul margine delle foglie, quasi mancanti sul resto della foglia e nelle infiorescenze. Gli oli essenziali vengono sintetizzati nel citoplasma delle cellule dei tricomi ghiandolari che ricoprono la maggior parte delle parti aeree delle piante. I tricomi sono costituiti da un piede, da un gambo e da una testa secretrice. Il piede della cellula è situato nell'epidermide e occasionalmente appare parzialmente affondato nel parenchima. Il gambo è di solito uni-bicellulare e presenta pareti laterali molto cutinizzate (Maleci Bini *et al.*, 2006). La forma dei tricomi nelle *Lamiaceae* può essere di due tipi: peltata e capitata (Hallahan, 2000). In particolare, la forma peltata è caratterizzata da una forma globulare causata dal distacco dello strato cuticolare dalla parete delle cellule secretici, a seguito del riversamento in questo spazio del materiale secreto. Nei tricomi capitati la singola cellula secretrice diffonde il secreto nell'ambiente senza accumularlo nello spazio sub-cuticolare. I tricomi capitati hanno due cellule secretrici, mentre i tricomi peltati hanno quattro cellule secretici (Werker, 2000). Le cellule secretrici producono olio che si accumula nella spazio sub-cuticolare e che viene liberato nell'ambiente quando il velo

cuticolare che lo contiene si rompe. Il processo di formazione delle ghiandole avviene contemporaneamente a quello dello sviluppo delle foglie, cosicché le foglie mature sono coperte esclusivamente da ghiandole sviluppate; il numero dei tricomi ghiandolari diminuisce dall'apice verso il basso e nella pagina inferiore (Turner *et al.*, 2000) .

### 1.3.2. Timo



**Figura 1.** *Thymus vulgaris* L. bianco-rosato, ermafroditi, crescono all'ascella delle foglie in infiorescenze a spiga e sono ad impollinazione entomofila, soprattutto ad opera delle api. I frutti sono degli acheni contenenti, ciascuno, quattro semi ricoperti da un guscio di colore marrone (Strasburger, 2007).

Il genere *Thymus* comprende numerose specie tra cui ricordiamo: *Thymus*

Il timo è un arbusto sempreverde che fa parte della famiglia delle *Lamiaceae*, sottofamiglia *Stachyoideae* (Figura 1). La sua altezza varia, in relazione alla specie coltivata, da pochi centimetri a più di una trentina; il portamento può essere eretto o strisciante, con un fusto di colore bruno-verdastro che diventa legnoso dal secondo anno di vita. Le foglie in quasi tutte le specie sono piccole e allungate, con una colorazione variabile dal verde più o meno intenso al verde chiaro, al grigio, all'argento, ricoperte da una fitta peluria in quasi tutte le specie. I fiori (figura 2) sono di colore



**Figura 2:** Fiore di *thymus vulgaris* L

*serpillum*, *Thymus citriodorus*, *Thymus zygis*, *Thymus herba barona* e *Thymus vulgaris*. Le specie *Thymus vulgaris* e *Thymus serpillum* sono le due utilizzate per le loro proprietà terapeutiche ed aromatiche. I principali costituenti responsabili delle innumerevoli virtù del timo sono i fenoli e, in particolare, il timolo (30-70%) e il carvacrolo (3-15%) (Kokkini, 1997).

### 1.3.3. Origano

Noto fin dall'antichità, l'origano deve il suo nome all'unione di due parole



greche: “*oros*”, che significa montagna e “*ganos*”, che significa splendore. Le sue proprietà terapeutiche erano conosciute e apprezzate già dagli Egizi; i Greci incoronavano gli sposi con ghirlande di origano, in quanto esso era ritenuto simbolo di felicità. In epoca romana è stato largamente impiegato anche in cucina. Il suo uso è continuato anche nei secoli successivi, ma per lo più limitato alle regioni del sud. In medicina veniva usato grazie al suo profumo penetrante come disinfettante di ambienti durante le

**Figura 3.** *Origanum vulgare* L.

epidemie, bruciandolo in ampi bracieri insieme a timo e menta.

È una pianta perenne erbacea con un rizoma lignificato strisciante dal quale si sviluppano i fusti, alti fino a 60-70 cm, alcuni dei quali portano solo foglie mentre altri sostengono l'infiorescenza; essi sono arrossati in alto, con peli patenti, a sezione quadrangolare. Le foglie presentano piccioli di 3-6 mm e lamina lanceolata, spesso asimmetrica alla base e dentellata. I fiori, raggruppati in un'infiorescenza corimbosa densa, possono essere di colore variabile: dal rosa al

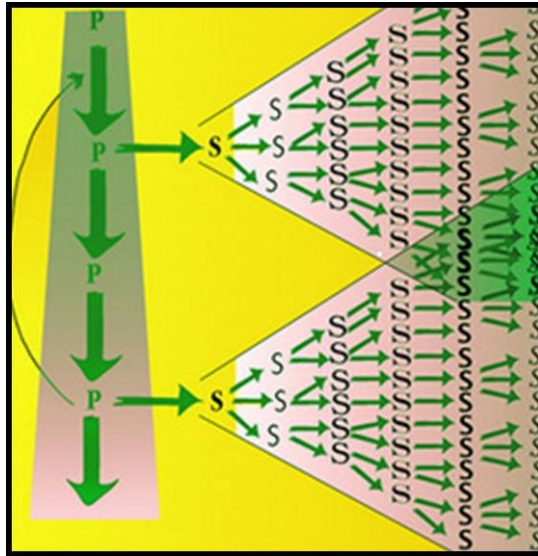
violetto, fino ad arrivare al bianco. Quasi privi di peduncolo con calice attinomorfo a 5 denti più o meno uguali, corolla a tubo dritto più breve dei denti calicini e brattee di 4-5 mm generalmente purpuree (figura. 3). Il frutto è un tetrachenio ovoidale e bruno.

Sei sottospecie sono state riconosciute in *Origanum vulgare* L. in base a differenze quali la presenza di peli, il numero di ghiandole sessili sulle foglie, dimensione e colore di brattee e fiori etc. (Strasburger, 2007). Esse sono:

1. *O. vulgare* L. spp. *vulgare* (Europa, Iran, India, Cina);
2. *O. vulgare* L. spp. *glandulosum* (Desfontaines) Ietswaart (Algeria, Tunisia);
3. *O. vulgare* L. spp. *gracile* (Koch) Ietswaart (Afganistan, Iran, Turchia, vecchia USSR);
4. *O. vulgare* L. spp. *hirtum* (Link) Ietswaart (Albania, Croazia, Grecia, Turchia);
5. *O. vulgare* L. spp. *viridulum* (Martrin-Donos) Nyman ( Afganistan, Cina, Croazia, Francia, Grecia, India, Iran, Italia, Pakistan);
6. *O. vulgare* L. spp. *virens* (Hoffmannsegg & Link) Ietswaart (Azzorre, Isole Baleari, Isole Canarie, Madeira, Marocco, Portogallo, Spagna) (Russo *et al.*, 1988).

#### **1.4. Metabolismo secondario delle piante officinali**

I metaboliti secondari sono composti sintetizzati dalle piante che, a differenza dei metaboliti primari, non svolgono ruoli fondamentali nelle funzioni vitali di base (divisione cellulare, crescita, respirazione, riproduzione): per questo, è stata loro attribuita per molto tempo una funzione di scarto, detossificazione, accumulo o eccesso di produzione di vie metaboliche primarie. Kossel (1891) fu il primo a definire questi composti come opposti ai metaboliti primari (D'Antuono *et al.*, 2000). In seguito Czapek (1921) li definì “endprodukt” in quanto sosteneva che derivassero dal metabolismo dell'azoto, grazie a “modificazioni secondarie” quali, ad esempio, le deaminazioni. Oggi sappiamo che molti di questi hanno nell'ecosistema la funzione di mediatori di segnali chimici e che sono indispensabili per la sopravvivenza delle specie. Sono sintetizzati in quantità molto bassa: infatti, rappresentano meno dell'1% del carbonio totale, sono spesso organo o tessuto-specifici, assolvendo precise funzioni e sono peculiari nelle diverse specie vegetali. Sono caratterizzati, infatti, da una sorprendente variabilità intra-specifica, comprendendo migliaia di composti e solo le recenti tecniche chimico-analitiche hanno permesso di accrescere le nostre conoscenze a tal riguardo. Il metabolismo secondario impiega gli stessi enzimi del metabolismo primario, ma anche quegli enzimi originatisi in seguito a duplicazioni geniche e variazioni alleliche (Pichersky 2000). L'insieme di queste mutazioni ha permesso, nel corso dell'evoluzione, alla generazione di un insieme ricco ed eterogeneo di composti secondari (Theis *et al.*, 2003) . Si assiste ad un'armoniosa regolazione delle varie vie biosintetiche che sono integrate nel metabolismo primario. Secondo Bu'lock (Maffei 1999), infatti, l'accumulo di metaboliti primari ha indotto la formazione di “valvole di sfogo” divergenti e la conseguente produzione di migliaia di molecole diverse. Questa risposta è fondamentale per il metabolismo della pianta, in quanto l'accumulo di un composto intermedio può avere effetti di inibizione retroattiva, bloccando e rallentando altre vie metaboliche.

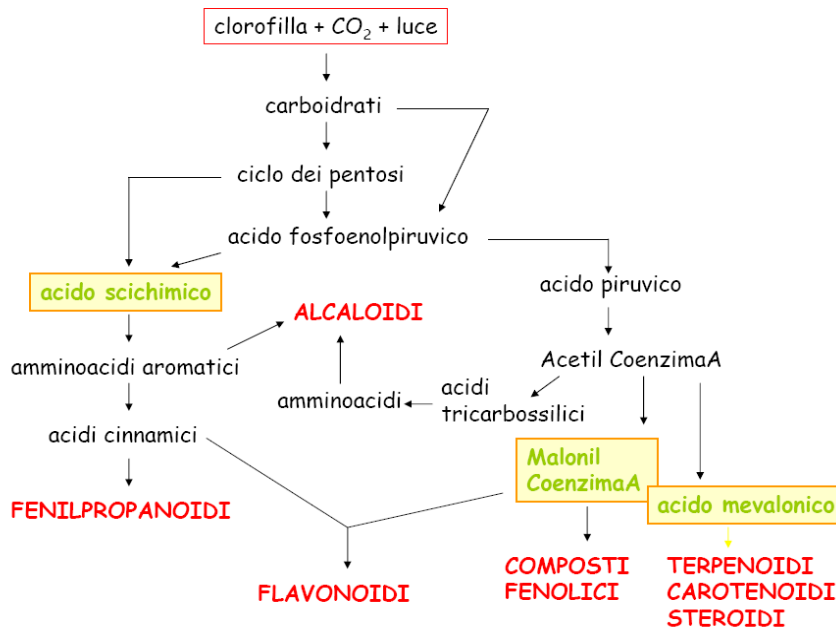


**Figura 4.** Schematizzazione del metabolismo secondario.

Mediante la produzione di vie alternative il problema è superato, ma si ripresenta nei prodotti finali della via neo-formata. Ecco, così, che il fenomeno si ripete e nascono nuove vie parallele in grado di “drenare” gli accumuli (figura 4, Maffei M.,).

#### 1.4.1. Principali pathway biosintetici

I composti secondari delle piante sono generalmente classificati, in accordo con la loro via biosintetica, in tre grandi famiglie molecolari: fenoli, terpeni e steroidi (detti terpenoidi) e alcaloidi (Bourgaud *et al.*, 2001) (figura 5).



**Figura 5.** Pathways biosintetici dei metaboliti secondari.



Il gruppo dei fenoli comprende i fenoli semplici, come acidi benzoici, acidi cinnamici, stilbeni e cumarine e i fenoli complessi, come flavanoidi, antociani e tannini. La biosintesi dei composti fenolici semplici deriva dalla via dell'acido scichimico, che determina la produzione di amminoacidi aromatici (fenilalanina e tiroxina) i quali vengono deaminati rispettivamente dagli enzimi fenilalanina ammonio liasi (PAL) e tirosina ammonio liasi (TAL), producendo acido trans-cinnamico e acido p-idrossicinnamico, che sono le unità di base dei fenoli.

I composti fenolici complessi hanno origine dal calcone che, per azione dell'enzima calcone isomerasi (CHI) produce la naringenina, un flavanone.

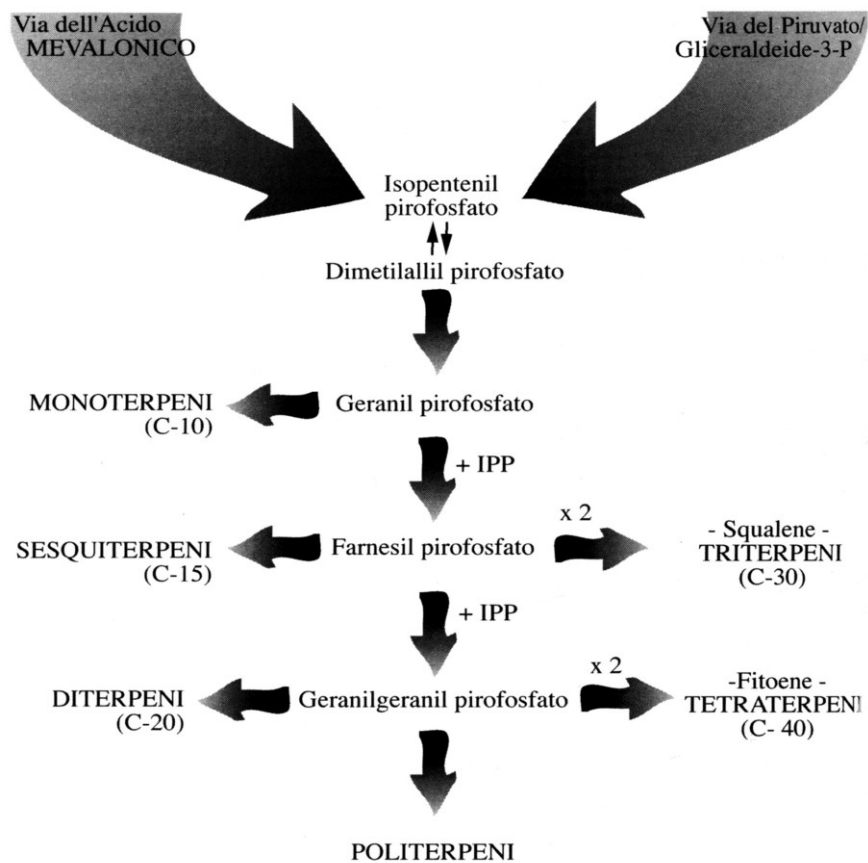
Da essa poi derivano i flavonoli e gli isoflavonoli, che in seguito a sostituzione e desaturazione forniscono isoflavoni, isoflavonoli e isoflavanoli.

I terpeni, detti anche isoprenoidi, sono costituiti dall'isoprene come unità base.

L'isopropene è una molecola costituita da 5 atomi di carbonio: quattro disposti linearmente, che presentano due doppi legami in posizione 1-3 e il quinto che forma una ramificazione in posizione 2 sotto forma di gruppo metilico. A seconda del numero di ripetizioni isopreniche, si distinguono le classi mono, di, tri, tetra, sesqui e politerpeni. Sono molte le funzioni dei terpeni nelle piante: i monoterpeni (C<sub>10</sub>) e i sesquiterpeni (C<sub>15</sub>), sono i principali costituenti degli oli essenziali; tra i diterpeni (C<sub>20</sub>) si distinguono le gibberelline, ormoni stimolatori di crescita; i triterpeni (C<sub>30</sub>) comprendono molti composti che fungono da deterrenti nei confronti degli erbivori.

La biosintesi avviene a partire dall'isopentenil pirofosfato (IPP) che condensa con il suo isomero dimetilallil pirofosfato per dare geranil pirofosfato, dal quale originano i monoterpeni. Altri precursori sono l'acido mevalonico e la gliceraldeide fosfato\piruvato. Mediante successive condensazioni con l'IPP, si giunge alla formazione delle diverse classi terpeniche (figura 6). I triterpeni derivano dalla condensazione di due molecole di farnesil pirofosfato e i tetra terpeni dalla condensazione di due molecole di geranil-geranil pirofosfato. I vari intermedi subiscono modificazioni successive che portano anche a ciclizzazioni.





**Figura 6.** Schema di biosintesi dei terpeni

Gli alcaloidi sono sostanze azotate in cui almeno uno degli atomi di azoto presenti deriva da un amminoacido e fa parte di un anello eterociclico o di un extraciclo (Roberts *et al.*, 1998). Sono classificati, in base alla loro origine biochimica e dal punto di vista biosintetico in:

- alcaloidi derivanti da amminoacidi: tirosina, fenilalanina, ornitina, lisina, istidina, triptofano, arginina ecc.;
- alcaloidi derivati da un composto purinico;
- terpeni amminati o pseudo alcaloidi;
- alcaloidi polichetici.

### 1.5. Oli essenziali e loro attività

Le piante aromatiche hanno tessuti specializzati nella secrezione di metaboliti secondari; questi tessuti sono situati in diverse parti. I prodotti di secrezione hanno natura chimica diversa: cristalli di ossalato di calcio, resine, gomme, mucillagini, terpeni, tannini, lattici, pigmenti, oli essenziali (Figueiredo *et al.*, 2008).

Questi ultimi sono i secreti più abbondanti, formati da miscele di molecole organiche volatili, solubili in solventi organici e insolubili in acqua, avente odore caratteristico della pianta che li produce. Le famiglie botaniche più ricche di oli essenziali sono le *Asteraceae*, le *Lamiaceae*, le *Rutaceae*, le *Liliaceae*, le *Pinaceae* (Figueiredo *et al.*, 2008). I costituenti di un'essenza possono essere raggruppati in quattro categorie principali:

- 1-idrocarburi non ramificati;
- 2-derivati del benzene;
- 3-terpeni aciclici e ciclici;
- 4-composti vari: ossigenati (aldeidi, chetoni, alcoli, esteri ed acidi), solforati od azotati.

I componenti di un olio essenziale possono poi subire trasformazioni chimiche nel corso dello sviluppo della pianta. Ad esempio, si è constatato che nei primi stadi di vegetazione la pianta presenta un' essenza contenente molti composti a funzione alcolica; durante il periodo di formazione e di sviluppo delle infiorescenze, gli acidi liberi che si trovano nella pianta reagiscono con gli alcoli formando esteri. Le sostanze odorose compaiono generalmente nelle parti verdi della pianta, sin dai primi mesi di vita, poi continuano a formarsi ed accumularsi fino alla fioritura, rallentando con il progredire della stessa (Figueiredo *et al.*, 2008).

Per un completo studio della formazione degli oli bisogna considerare alcuni aspetti, quali l'effetto della crescita (Miguel *et al.*, 2004), il momento stagionale, l'influsso climatico (Figueiredo *et al.*, 2008). Ad esempio, le piante che crescono in alta montagna, dove le funzioni clorofilliane sono più attive per effetto della maggior luce, danno oli più ricchi in esteri di quelli che si trovano ad altitudini minori. Le sostanze che comunemente conferiscono le proprietà aromatiche si

accumulano in tutti gli organi della pianta (steli, foglie, gemme, fiori, semi, frutti, legno e radici), sebbene siano maggiormente sintetizzati nelle parti aeree, in particolar modo in strutture specializzate dette peli ghiandolari, dotti resiniferi, ghiandole lisigene (Novak *et al.*, 2005). I costituenti degli oli essenziali possono essere catalogati in due classi: quella dei derivati terpenoidici, costituita da terpeni, multipli dell'isoprene (due o tre unità), che trae origine biosintetica dall'acido mevalonico, e quella dei composti aromatici, biogeneticamente derivanti dall'acido scichimico e dai fenilpropanoidi.

Gli oli essenziali possono essere classificati in base al costituente chimico maggiormente rappresentato. I principali gruppi sono i seguenti:

- a prevalente contenuto di idrocarburi (limone, ginepro);
- a prevalente contenuto di aldeidi (cannella, mandorlo, melissa);
- a prevalente contenuto di alcoli (sandalò, geranio, coriandolo);
- a prevalente contenuto di chetoni (carvi, salvia, assenzio, maggiorana);
- a prevalente contenuto di fenoli (anice, timo comune, santoreggia, garofano);
- a prevalente contenuto di composti solforati (aglio, cavolo);
- a prevalente contenuto di esteri (lavanda, mirtillo, pompelmo);
- a prevalente contenuto di acidi (sedano, fragola);
- a prevalente contenuto di lattoni (bergamotto, cocco) (Catizone *et al.*, 1986).

Lungo gli anni gli oli essenziali e altri estratti delle piante, hanno suscitato un notevole interesse come risorsa di prodotti naturali. Sono stati saggiati come rimedi alternativi a numerose malattie. Gli oli essenziali hanno mostrato possedere proprietà antibatteriche, antifungine, antivirali, insetticide e antiossidanti (Tepe *et al.*, 2004). Alcuni oli essenziali vengono usati anche nel trattamento del cancro (Sylvestre *et al.*, 2006).

Gli oli essenziali vengono impiegati anche per la conservazione dei cibi (Faid *et al.*, 1995), nell'aromaterapia (Shaw *et al.*, 2007), nell'industria cosmetica.

In passato, così come negli ultimi anni, c'è stato un notevole interesse per le proprietà antimicrobiche degli oli essenziali. Il meccanismo di azione degli oli

essenziali sui microrganismi non è stato molto indagato. Alcuni autori hanno attribuito l'attività antimicrobica degli oli essenziali all'interazione del loro gruppo funzionale (essenzialmente il fenolo) con lo sviluppo delle cellule microbiche, mentre altri autori hanno evidenziato come gli oli essenziali causano un deterioramento della membrana citoplasmatica (Ben Arfa *et al.*, 2005). E' stato anche ipotizzato che la complessa costituzione degli oli essenziali rappresenta una forte barriera per la crescita dei microrganismi patogeni. Questa teoria è ben documentata nel dettagliato studio sull'attività antifungina dell'olio essenziale di *Myrica gale* (Carlton *et al.*, 1992). Dall'analisi di diversi oli essenziali per le loro proprietà biocida nei riguardi di numerosissimi generi di batteri e funghi, si è constatato come essi abbiano esercitato un'inibizione nella crescita di questi microrganismi, dipendente dalla concentrazione dell'olio e dalla loro composizione chimica. Oltre a proprietà antimicrobiche (Mourey e Canillac, 2002) è stato dimostrato che gli oli essenziali posseggono anche proprietà antivirali (Bishop, 1995), antimicotiche, antitossinogene (Ultee *et al.*, 2000), antiparassitarie (Pessoa *et al.*, 2002), insetticida (Karpouhtsis *et al.*, 1998) ed antigerminative. Queste caratteristiche sono, senza dubbio, correlate alle funzioni che tali oli hanno nelle piante (Mahmoud e Croteau, 2001).

Per identificare la composizione dei diversi oli essenziali si sfrutta la gascromatografia e spettrometria di massa (Dafera *et al.*, 2003). Gli oli essenziali possono essere composti da miscele di più di sessanta singoli componenti (Russo *et al.*, 1998). Alcuni componenti possono essere presenti in percentuali maggiori dell' 85%, mentre altri possono essere presenti solo in tracce. I componenti fenolici sono principalmente responsabili delle proprietà antibatteriche degli oli essenziali (Cosentino *et al.*, 1999).

### **1.5.1. Olio essenziale di timo**

Partendo dal presupposto che due individui della stessa specie possono sembrare del tutto uguali, da un punto di vista chimico potrebbero essere diversi.

Il termine "chemiotipo" definisce proprio questa diversità intraspecifica. I chemiotipi sono il prodotto dell'adattamento a varie condizioni ambientali in cui

la stessa specie può trovarsi a crescere: la specifica produzione chimica permette alla pianta di sfruttare meglio il terreno, difendersi da parassiti e resistere a malattie. Il timo è una specie particolarmente prolifica di chemiotipi. Infatti, Vengono classificati 7 chemiotipi tra i quali si annoverano:

- *Thymus vulgaris* ct. timolo, varietà che, per la presenza di timolo, ha una forte azione antisettica;
- *Thymus vulgaris* ct. carvacrolo, che ha un effetto simile al precedente ma grazie al coinvolgimento del principio attivo carvacrolo;
- *Thymus vulgaris* ct. linalolo, che ha un'azione meno aggressiva rispetto ai precedenti. Questo chemiotipo è antibatterico, fungicida (controlla *C. albicans*), viricida, parassitocida, vermifugo ma anche neurotonico e uterotonico;
- *Thymus vulgaris* ct. thuyanol-4, che ha un'azione antimicrobica, soprattutto contro i virus.

La Farmacopea Europea riconosce solamente il chemiotipo a timolo contenente il 30-70% di timolo e il 3-15% di carvacrolo

L'attività batteriostatica e battericida del timo, sotto forma di estratto idroglicerico od olio essenziale o di impiastro umido dalla pianta intera, veniva sfruttata per lesioni ed escoriazioni infette della cute, soprattutto per ferite belliche, già a partire dalla seconda metà del secolo XIX e dai primi 30 anni del XX secolo. Favorisce, infatti, l'allontanamento dalla superficie cutanea di microrganismi patogeni. L'attività del timo è stata ulteriormente documentata in un recente studio microbiologico nei confronti di *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Attualmente il timo è impiegato in preparazioni cosmetiche utili nel trattamento coadiuvante di terapie dermatologiche specifiche, nella prevenzione in ambienti a rischio (piscine, palestre, saune). L'olio di timo possiede anche una buona attività nematocida (Zaccardelli *et al.*, 2007). Tale proprietà gli viene conferita in particolar modo dai suoi principali componenti: il timolo e il carvacrolo, ma anche dal p-cymene e γterpinene. precursori del timolo e del carvacrolo (Abu Lafi *et al.*, 2008).

### 1.5.2. Olio essenziale di origano

L'olio essenziale delle specie di origano è molto variabile sia in termini quantitativi che in termini qualitativi. I differenti taxa possono essere distinti in tre gruppi principali:

1. Taxa “poveri”, con un contenuto di olio minore dello 0,5% (ml/100 g di peso secco), come ad esempio *Origanum calcaratum* (Karousou, 1995);
2. Taxa con un contenuto di olio compreso tra 0,5 e il 2%, come ad esempio *Origanum mifrophyllum*, conosciuto anche come maggiorana di Creta;
3. Taxa “ricchi” in olio essenziale con un contenuto in olio superiore al 2%, come ad esempio *Origanum vulgare* spp. *hirtum* (origano greco) e *Origanum onites* (origano turco) (Kokkini *et al.* 1991; Vokou *et al.* 1988,).

In relazione alla chimica dell'olio essenziale il genere *Origanum* mostra due composizioni differenti: la prima è caratterizzata da composti fenolici, carvacrolo e/o timolo tipica di *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* e *Origanum onites*; la seconda presenta dominanza di sesquiterpeni, come nel caso di *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* (Kokkini, 1997). Dalla letteratura si è visto che *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* mostra una resa in olio essenziale estremamente bassa. I principali costituenti sono sabinene,  $\beta$ -ocimene,  $\beta$ -caryophyllene e germacrene, mentre il timolo e il carvacrolo sono assenti. Al contrario, *Origanum vulgare* spp. *hirtum* ha una resa più elevata in olio essenziale, i cui principali composti sono p-cymene,  $\gamma$ -terpinene timolo e carvacrolo (Russo *et al.*, 1988).

Oltre ai due chemiotipi a timolo e a carvacrolo, esistono tipi intermedi che contengono ambedue i composti e chemiotipi con un alto contenuto dei due precursori, p-cymene e  $\gamma$ -terpinene (D'Antuono *et al.*, 2000).

Da saggi *in vitro* condotti su microrganismi fitopatogeni (Zaccardelli *et al.*, 2006) si è visto che gli oli essenziali estratti dalla parte aerea delle piante di origano, mostrano una spiccata attività biocida nei confronti dei principali batteri e funghi patogeni di colture ortive. Gli oli di origano posseggono anche attività nematocida. Inoltre, da studi condotti *in vitro*, l'olio di origano è risultato essere attivo anche come inibitore della germinazione dei semi di piante infestanti (Zaccardelli *et al.*, 2007). Questa proprietà, associata alla mancanza di effetto

antigerminativo verso i semi di diverse colture agrarie, tra le quali le leguminose, fa pensare ad un possibile impiego di questo olio per il controllo delle erbe infestanti ( Zaccardelli *et al.*, 2007).

#### **1.6. Fertilizzanti innovativi per l'orticoltura sostenibile**

Il terreno è la sintesi dell'interazione della parte minerale assieme alla frazione organica e biologica; pertanto possiamo parlare di terreno propriamente detto solo quando in esso è presente del carbonio organico.

Ogni volta che noi apportiamo materiale organico al terreno, questo si comporta come un grande digestore compiendo un lento processo di decomposizione (mineralizzazione) e di rielaborazione della materia apportata (umificazione) fino alla formazione della parte più stabile chiamata humus (sostanze umiche). La parte più attiva della sostanza organica interagisce con la frazione minerale e con la microflora terricola, influenzando le proprietà chimiche e fisiche del terreno, riducendone i difetti fisici ed incrementando di conseguenza la ritenzione idrica ed il contenuto dei nutrienti biodisponibili. Il lento rilascio degli elementi (azoto, fosforo e potassio) grazie alla mineralizzazione consente, inoltre, di dare al terreno una maggiore e prolungata fertilità. Le quantità di sostanza organica presente nel terreno dipendono non solo dalle quantità e qualità dei concimi organici o degli ammendanti apportati al suolo, ma anche dalla velocità e dal tipo di processi di mineralizzazione ed umificazione a cui sono sottoposti. La mineralizzazione della sostanza organica è influenzata dalla temperatura, dalla disponibilità di ossigeno ed umidità, dal pH, dall'apporto di sostanze nutritive inorganiche, dal rapporto C/N dei residui vegetali, dalle lavorazioni. La sostanza organica è la principale fonte di energia e di nutrienti per i microrganismi del suolo e per i loro processi vitali. Con la respirazione il carbonio organico ritorna nell'atmosfera, sotto forma di CO<sub>2</sub>, mentre con il processo di umificazione il carbonio permane nel terreno, sotto forma di molecole umiche. L'accumulo dipende ovviamente oltre che dal clima, dai tipi di suolo e dalla tipologia di sostanza organica apportata. La drastica diminuzione nei Paesi industrializzati dell'impiego di concime organico ha comportato la progressiva diminuzione della sostanza organica nel terreno con

conseguenze anche sensibili sull'aumento della CO<sub>2</sub> atmosferica. E' in questo contesto che va posta un'attenzione particolare alla frazione umida dei rifiuti domestici costituita da materiale organico che, unitamente al rifiuto verde (proveniente da mercati ortofrutticoli, supermercati, ecc.), rappresenta oltre un terzo del totale della raccolta differenziata ed ha un enorme valore economico. La sostanza organica, attraverso un processo aerobico controllato, per effetto della flora microbica si decompone ottenendo il compost un ottimo prodotto utilizzabile in agricoltura in quanto ricco in humus, flora microbica e microelementi.

Appare quindi evidente che l'accumulo della sostanza organica nel terreno, oltre ai vantaggi degli effetti concimante ed ammendante, determina una grande immobilizzazione della CO<sub>2</sub> nel suolo, formando in tal modo un enorme serbatoio di carbonio con enormi e molteplici vantaggi.

L'utilizzo di materiali organici quali un buon compost o determinati sottoprodotti industriali, come gli scarti delle filiere bioenergetiche (panelli e farine), rappresenta la giusta strada da seguire nell'orticoltura ecosostenibile.. In una civiltà così industrializzata dove molti sono i rifiuti organici prodotti dai diversi attori del sistema, bisogna agire nel massimizzare e nel valorizzare l'intero ciclo economico ed in questo l'intero comparto dell'agricoltura può e deve ritagliarsi un ruolo fondamentale

#### **1.6.1. Il compost**

Il compost può avere diverse origini. Oggi quelli più studiati e impiegati sono quelli ottenuti dalla frazione organica dei residui solidi urbani, dagli scarti agroindustriali, dai residui di giardini e di parchi pubblici e privati.

Il grosso problema presente oggi, ma del tutto risolvibile, è quello di disporre di un compost di buona qualità che risulti utile all'agricoltura e che aiuti a smaltire residui organici di scarto, soprattutto quelli solidi urbani. Tale prodotto si trova già sul mercato come ammendante organico, Inoltre, il compost conferisce una serie di effetti positivi, che vanno a migliorare le caratteristiche fisico-chimiche dei terreni, come ad esempio la maggiore porosità, sofficità e riduzione degli interventi irrigui. Il compostaggio è un tema antico e attuale allo stesso tempo.



Della questione rifiuti si parla ormai da molto tempo, mentre ancora troppo poco si parla delle opportunità che possono derivare da una corretta valorizzazione delle risorse che possono originarsi dai rifiuti. Tutto il processo rimanda a un'ottimizzazione della raccolta differenziata che porti alla sottrazione della parte organica dai rifiuti solidi urbani, rimuovendo dagli stessi la frazione più nociva da un punto di vista ambientale e sanitario. Più in generale, affrontare e risolvere il problema rifiuti aiuta a ridare a questa materia uno *status* di risorsa, immettendola nuovamente nel ciclo produttivo. Con l'utilizzo del compost come ammendante in agricoltura, si vuole supplire anche alla carenza della sostanza organica che tende a determinare l'impoverimento produttivo e il lento declino qualitativo di molti suoli della Campania.

Dalla bibliografia risulta che il compost da F.O.R.S.U. viene utilizzato per mantenere la produttività dell'agroecosistema nel lungo termine (Crecchio *et al.*, 2004). Esso pertanto può rappresentare una valida alternativa al letame e agli altri ammendanti in commercio, offrendo le necessarie garanzie in termini di tutela ambientale e di salvaguardia della salubrità delle produzioni agricole. Il compost svolge un'ottima funzione ammendante, una buona azione fertilizzante e non arreca nessun effetto fitotossico sulla germinazione della semente. Il compost di buona qualità ha dimostrato di essere un prodotto in grado di migliorare nel tempo la struttura e l'attività biologica dei terreni. Inoltre ha dimostrato di avere, oltre ad un elevato valore agronomico, anche un valore ambientale di tutto rispetto: con l'impiego di compost si possono ridurre gli apporti dei fertilizzanti chimici, producendo effetti positivi sulle caratteristiche dei terreni con indubbi vantaggi quali maggior lavorabilità dei suoli e la minore necessità di irrigazione. L'uso del compost come ammendante può influire sulla degradazione degli agrofarmaci nel suolo, rallentandone i processi demolitivi; sulla cinetica degli enzimi del suolo si nota come le ossidoreduttasi, quali deidrogenasi e catalasi, aumentino con l'apporto di sostanza organica, indicando un aumento del metabolismo microbico nel suolo a seguito della mineralizzazione delle frazioni di C organico contenute negli ammendanti. Altre attività enzimatiche, come le fosfatasi e le Ureasi, diminuiscono, probabilmente perchè vengono colpite dai metalli pesanti contenuti nei rifiuti solidi urbani. Da lavori condotti nella Piana del Sele emerge che

apportando al suolo dalle 30 alle 45 t/ha di compost, si ha un incremento notevole di batteri e funghi e, di conseguenza, aumentano diversi parametri tra cui la respirazione e le attività enzimatiche, soprattutto l'attività idrolasica e arilsolfatasica (Zaccardelli *et al.*, 2005). inoltre, dall'analisi del polimorfismo del DNA del suolo, si riscontra che tra i diversi trattamenti adottati esiste una diversa composizione delle comunità microbiche (Zaccardelli *et al.*, 2005). Un terreno non ammendato, dopo tre anni, rispetto ad uno ammendato, presenta un minore potere tampone e una minore capacità di scambio cationico (Zaccardelli *et al.*, 2006). Il compost, comunque, va somministrato al terreno correttamente, per evitare un aumento della concentrazione salina e dei metalli pesanti (Zaccardelli *et al.*, 2006).

#### **1.6.2. Le farine di disoleazione**

Si tratta di prodotti di scarto ottenuti dal processo industriale di estrazione meccanica e chimica dell'olio dai semi delle piante oleaginose, olio che potrebbe essere destinato alla produzione di biodiesel. Questi sottoprodotti, per non costituire un costo aggiuntivo ed un problema ambientale, devono essere valorizzati tecnicamente ed economicamente, per poter rafforzare l'intera filiera del biodiesel. Le farine di estrazione, alla fine del processo produttivo, posseggono ancora delle buone proprietà potenzialmente sfruttabili. Infatti contengono un buon tenore di sostanza organica e discrete quantità di azoto non dilavabile e fosforo assimilabile. Pertanto, queste farine sono, utilizzabili come ammendanti e fertilizzanti del terreno.

Le farine aggiunte al suolo stimolano le attività biologiche, soprattutto nelle prime settimane (Zaccardelli *et al.*, 2007).

Tra le diverse farine esistenti, quelle a base di *Brassica carinata* sono anche commercializzate per le loro proprietà biofumiganti, oltre che ammendanti, risultando efficaci nel controllo di funghi fitopatogeni tellurici e nematodi.

### **1.7. I batteri promotori della crescita delle piante (PGPR) e induttori di resistenza (ISR)**

Durante la loro crescita le piante interagiscono con la rizosfera, ovvero quella parte di suolo più vicina alle radici influenzata dagli essudati radicali e sede di un'intensa attività da parte dei microrganismi che trovano nutrimento proprio dalle sostanze secrete dalle radici. Tali microrganismi possono essere deleteri, commensali oppure svolgere un'azione positiva nei confronti delle piante.

Il termine PGPR "*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*", introdotto nel 1978 da Kloepper e Schroth, comprende microrganismi di numerosi generi: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Rhizobium* e *Frankia*. Questi microrganismi, colonizzando la rizosfera delle piante, promuovono la crescita di radici e della parte aerea, inibendo lo sviluppo di batteri e funghi fitopatogeni.

I PGPR hanno notevole interesse per l'agricoltura, perché fungono da biofertilizzanti e biostimolanti. Spesso, nelle piante, inducono resistenza ai patogeni.

#### **1.7.1. Meccanismi di azione**

La rizosfera rappresenta la parte del suolo con la maggiore densità di organismi viventi, radici, microrganismi, artropodi e altri animali che stabiliscono una complessa rete di relazioni. L'interazione tra microrganismi e radici è regolata da complessi meccanismi e prevede, come primo processo, la colonizzazione, ossia il contatto fisico tra cellula microbica e superficie radicale. Meccanismo, questo, fondamentale per stabilire una corretta simbiosi, promosso sia dalla radice che dalle cellule microbiche attraverso l'attivazione di meccanismi sinergici. Le radici attivano i processi di essudazione radicale e di rizo-deposizione che consistono nel rilascio, intorno alla radice stessa, di una complessa serie di molecole che fungono da nutrienti (zuccheri, acidi organici, amminoacidi e composti fenolici) oppure da segnali di chemiotassi o componenti di matrici polimeriche, che stabilizzano i biofilm microbici. I microrganismi, a loro volta, attivano una serie di processi metabolici che permettono loro di arrivare a colonizzare, in maniera massiccia e stabile, le radici vegetali.

Avvenuta la colonizzazione delle radici, i PGPR agiscono mediante meccanismi di promozione della crescita diretti, quali l'azotofissazione, la solubilizzazione del fosforo, la produzione di fitormoni e di siderofori.

L'**azotofissazione** consiste nella riduzione dell'azoto molecolare in ammoniaca (che viene trasformata in nitrato prontamente assorbito dalle piante attraverso i processi di ammonificazione e nitrificazione,) sia da parte di attinomiceti del genere *Frankia* e di batteri del genere *Rhizobium*, capaci di stabilire delle relazioni simbiotiche con le piante leuminose, sia da parte di batteri azotofissatori che non producono noduli radicali (quindi non simbionti) appartenenti al genere *Azospirillum*, *Pseudomonas* e *Bacillus*.

La **solubilizzazione del fosforo** è un processo molto importante dato che il fosforo, sebbene abbondante nella maggior parte dei suoli, non è prontamente disponibile per le piante. Questo elemento rappresenta uno dei principali nutrienti limitanti per la crescita vegetale. E' presente nel suolo in due forme: fosfati minerali, rappresentati da fosfati di calcio e idrossiapatite e fosfati inorganici, rappresentati da fitati, inositol-fosfato e fosfoesteri. La maggior parte di queste forme del fosforo sono scarsamente solubili o insolubili; di contro, le piante possono assorbire questo elemento solo nelle due forme solubili degli ioni monobasico  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e dibasico  $\text{HPO}_4^-$ . La solubilizzazione del fosforo è il meccanismo di promozione della crescita radicale più comune tra i microrganismi rizosferici ed avviene grazie alla produzione di acidi organici quali acetato, lattato, ossalato, tartrato, succinato e gluconato, che acidificano l'intorno cellulare. La mineralizzazione del fosfato organico nel suolo è, invece, mediata da reazioni enzimatiche catalizzate da fosfatasi acide e fitasi.

La produzione di **fitormoni** da parte di microrganismi PGPR, in aggiunta a quelli già prodotti dalla pianta, altera gli equilibri influenzando la crescita e lo sviluppo vegetale, come l'iperproliferazione di peli radicali e di radici laterali, con conseguente aumento nell'assorbimento di ioni. I principali ormoni vegetali coinvolti in questi e altri fenomeni fisiologici sono: l'auxina o acido indol-3-acetico (IAA), le citochinine, l'etilene, l'acido abscissico (ABA) e le giberelline. Vari ceppi PGPR producono acido indolacetico (IAA) in grado di stimolare l'allungamento delle radici primarie e lo sviluppo delle radici secondarie (Loper e

Scroth, 1986). Nelle piante l'IAA si forma dal triptofano, che viene deaminato per via ossidativa tramite la formazione di acido indol-3-piruvico, o decarbossilato tramite la formazione di triptamina. Altri PGPR, oltre che stimolare lo sviluppo della pianta, producono l'amonociclopropano-1-carbossilato deaminasi, che degrada l'ACC precursore dell'etilene oppure producono antibiotici fitotossici che inibiscono la sintesi dell'etilene, un fitoregolatore gassoso che opera come inibitore della crescita e promuove la filloptosi. L'alta concentrazione di IAA risultante in rizosfera dalla somma di quello prodotto dalle piante e di quello sintetizzato dai batteri, stimola direttamente l'allungamento, il differenziamento e la proliferazione delle radici, migliorando l'assorbimento di nutrienti e acqua e consentendo alla pianta di superare meglio gli stress abiotici (soprattutto idrico) e biotici (attacco di microrganismi fitopatogeni). D'altra parte, l'eccesso di IAA può causare effetti negativi, poiché induce la sintesi di 1-aminociclopropano-1-carbossilato sintetasi, enzima chiave per la biosintesi di ACC precursore dell'etilene. Alte concentrazioni di IAA, quindi, possono inibire l'allungamento della radice, diminuire la crescita della pianta e il differenziamento, nonché la proliferazione cellulare. Numerosi sono i microrganismi che producono giberelline e citochinine che, come le auxine, stimolano la crescita e promuovono l'azotofissazione.

I **siderofori** sono agenti chelanti che legano e trasportano il Ferro. Nei suoli, nonostante l'abbondanza del ferro, la concentrazione della forma ferrica  $\text{Fe}^{3+}$  è molto bassa. Gran parte dei microrganismi hanno sviluppato una strategia per l'acquisizione del ferro basata sulla produzione di siderofori, molecole con forte affinità per gli ioni  $\text{Fe}^{3+}$ . I siderofori sono prodotti quando l'organismo si trova in un ambiente con carenze di ferro (Weller, 1988). Il complesso ferro-sideroforo che ne risulta, chiamato ferrisideroforo, è generalmente indisponibile per gli altri organismi, perché il ceppo che lo produce lo utilizza grazie a un recettore molto specifico. In seguito il  $\text{Fe}^{3+}$  è trasportato nel citoplasma e ridotto in  $\text{Fe}^{2+}$ . Ad ogni tipo di sideroforo corrisponde un recettore estremamente specifico e, allo stato attuale, i siderofori denominati pioverdina o pseudobactina, prodotti da batteri del genere *Pseudomonas*, hanno la più forte affinità per il ferro. La fluorescenza degli *Pseudomonas* è dovuta proprio a questi siderofori. Altri siderofori, prodotti dagli

*Pseudomonas* spp. sono: la piochelina, la pseudomonina, il PDTC (Pyridine-2, acido 6-dithiocarboxilic), la quinolobactina, la corrugatina e la nocardamina. Questi siderofori hanno un'affinità per il  $\text{Fe}^{3+}$  più bassa delle pioverdine; invece, alcuni di essi, come la piochelina, sono dei buoni chelanti di altri ioni metallici, come il  $\text{Cu}^{2+}$  e lo  $\text{Zn}^{2+}$ . Ceppi di *Pseudomonas* fluorescenti hanno dei recettori supplementari che gli permettono di ricavare il ferro sottraendolo ai patogeni del terreno, inibendone così lo sviluppo (Kloepper *et al.*, 1980).

Oltre a meccanismi diretti, esistono anche meccanismi di promozione della crescita indiretti, quali la competizione, l'antagonismo e l'induzione di resistenza nelle piante.

La **competizione** dei PGPR nei confronti di altri microrganismi rizosferici anche dannosi, avviene sia per la colonizzazione della radice (competizione per lo spazio) che per gli elementi indispensabili per la crescita (competizione per i nutrienti).

L'**antagonismo** sui patogeni avviene attraverso la produzione di una grande varietà di antibiotici, tra i quali i più importanti sono: il 2,4-diacetilfloroglucinolo (DAPG), le fenazine, la pioluteorina e la pirrolnitrina; l'oligomicina A, la kanosamina, la zwittermicina A e la xantobaccina, prodotti da *Bacillus*, *Streptomyces* e *Stenotrophomonas* spp. Certi batteri producono metaboliti secondari volatili come ammoniaca e acido cianidrico (HCN), efficaci contro diversi batteri e funghi fitopatogeni. In generale la produzione di antibiotici nella rizosfera dipende direttamente dalla densità dei PGPR: sopra un certo livello (tipicamente  $10^5$ - $10^6$ CFU/g di radici) le cellule batteriche rinforzano mutualmente la produzione di metaboliti extracellulari; al contrario, sotto questa soglia, le cellule sono più riluttanti a impegnare delle risorse cellulari sostanziali per il metabolismo secondario, fenomeno noto come "Cell-to-Cell Signaling";

L' **induzione di resistenza nella pianta** (ISR = *Induced Systemic Resistance*), permette alla pianta di difendersi contro vari patogeni. Tale processo è comparato alla resistenza acquisita SAR "*Systemic Acquired Resistance*" meccanismo, questo, di difesa della pianta in risposta a una pre-infezione del patogeno. La risposta della pianta a tale pre-infezione induce a una reazione ipersensitiva, riconoscibile da una lesione necrotica locale del tessuto e da un accumulo nelle

cellule della pianta di acido salicilico (SA). Tale SA attiva i meccanismi di difesa della pianta a discapito della crescita. L'ISR, al contrario, non induce a nessun sintomo visibile sulla pianta e raramente le cellule vegetali contengono acido salicilico: il processo è infatti mediato dall'intervento dell'acido jasmonico e dell'etilene coinvolti come molecole segnale (Uta Von Rade *et. al.*, 2005).

L'ISR è comunque associata a un aumento della sensibilità delle cellule vegetali a questi ormoni, più che alla loro sovrapproduzione, per cui la principale differenza tra ISR e SAR è che la SAR accumula proteine collegate alla patogenicità (PR proteins) mentre l'ISR non induce la sintesi di tale proteine, se non in quantità molto piccole, preparando le piante a reagire rapidamente ed in modo incisivo all'attacco del patogeno.

#### **1.7.2. Le principali specie batteriche coinvolte**

La maggior parte dei batteri PGPR appartengono principalmente a due generi: *Pseudomonas* e *Bacillus*. I membri del genere *Pseudomonas* sono dei batteri Gram-negativi a forma di bastoncino, caratterizzati da un metabolismo versatile, una respirazione aerobica (anche se alcuni ceppi sono capaci di respirare anaerobicamente, utilizzando il nitrato come accettore finale di elettroni) e una mobilità dovuta a uno o diversi flagelli polari. In questi ultimi anni una distinzione è stata fatta tra gli *Pseudomonas sensu stricto* e i generi *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Acidovorax* e *Comamonas*. Il genere *Pseudomonas sensu stricto* comprende numerose specie (più di 40) che si ritrovano in gran quantità nella maggiore parte degli ambienti naturali e comprende alcune specie patogene per le piante (*P. syringae*, *P. cichorii*, *P. marginalis*, *P. viridiflava*) e altre, invece, benefiche. Gran parte degli *Pseudomonas* a effetto PGPR sono del gruppo degli *Pseudomonas* fluorescenti, così chiamati perché producono dei siderofori fluorescenti e comprendono le specie *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. brassicacearum*, *P. aureofaciens* e ceppi della specie *P. aeruginosa*.

Un secondo gruppo di *Pseudomonas* PGPR, numericamente meno rappresentato, è quello degli *Pseudomonas* non-florescenti, che non producono siderofori o che

producono siderofori non fluorescenti e comprende le specie *P. stutzeri*, *P. corrugata*, *P. frederiksbergensis* e *P. graminis*.

Generalmente, esiste all'interno di ognuna di queste specie una grande variabilità. A livello della rizosfera, numerosi fattori influenzano sia la presenza dell'una o dell'altra specie di *Pseudomonas* PGPR, sia la diversità all'interno di una certa specie. Questi fattori sono, per ordine d'importanza:

- l'origine geografica e il clima;
- il tipo di suolo. I numerosi fattori abiotici e biotici che caratterizzano il suolo e l'habitat rizosferico modificano la composizione e l'attività delle comunità di *Pseudomonas* PGPR;
- le pratiche agricole. Le lavorazioni del terreno, la fertilizzazione, la rotazione influenzano le comunità microbiche;
- gli altri microrganismi presenti nella rizosfera, che interagiscono sia positivamente che negativamente modificando la struttura delle comunità;
- la pianta ospite, in quanto le comunità microbiche sono regolate dalla presenza delle radici delle piante che determinano un "effetto rizosferico", che porta ad una maggiore densità dei microrganismi nel suolo aderente alle radici rispetto a quello lontano da queste utime.

Il genere *Bacillus*, comprende specie per molte delle quali l'habitat primario è rappresentato dal suolo e dalla rizosfera. Le cellule sono a forma di bastoncino diritto, Gram positivi, aerobi, resistenti a radiazioni UV e ionizzanti.

La maggior parte dei batteri di questo genere è caratterizzata dalla capacità di produrre spore, una forma resistente del batterio importante per la sopravvivenza dello stesso e che, dal punto di vista ecologico, permette il completamento di cicli vitali abbastanza complessi. Oltre a fissare l'azoto, molte specie sono in grado di stimolare cambiamenti dei profili d'espressione dell'ospite vegetale. Tra le specie di *Bacillus* maggiormente coinvolte come PGPR si ricordano il *Bacillus cereus* e il *Bacillus subtilis*. L'attività antibatterica di molti dei ceppi del genere *Bacillus* è mediata da diversi sistemi, tra cui le autolisine, particolari enzimi che caratterizzano il peptidoglicano, attivati durante la divisione cellulare. Questi enzimi esplicano un'attività d'idrolisi delle pareti cellulari e, quindi, contribuiscono alla lisi cellulare. Altre molecole con un importante ruolo nel



biocontrollo sono le batteriocine. I fattori antifungini che i ceppi del genere *Bacillus* producono sono essenzialmente le chitinasi e le  $\beta$ -1,3-glucanasi, attive contro la parete cellulare fungina. Oltre ai microrganismi dei generi *Pseudomonas* e *Bacillus*, numerosi sono i PGPR di altre specie tra cui *Acetobacter diazotrophicus*, *Rhodococcus* spp., *Herbaspirillum seropedicae*, *Azoarcus* spp., ma quelli che hanno trovato anche un utilizzo pratico sono i batteri del genere *Azospirillum*, presente con cinque specie: *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopaeferens* e *A. irakense*. I batteri del genere *Azospirillum* sono degli alfa-proteobatteri, Gram-negativi, mobili, azoto-fissatori liberi. Essi sono capaci di utilizzare una vasta gamma di fonti di carbonio e azoto che li rende adatti a colonizzare un ambiente ricco di competizione come la rizosfera. In condizioni sfavorevoli, come nel caso di limitazione di nutrienti o di acqua, possono formare delle "cisti", cellule di dimensioni maggiori, ricche di granuli di poli-beta-idrossibutirrato che fungono da materiale di riserva in condizioni di stress.

### **1.7.3. L'impiego di PGPR in agricoltura**

Lo studio dei regolatori della crescita dei vegetali di origine microbica è di grande interesse agrario in quanto offre grandi potenzialità per eventuali applicazioni agronomiche. Uno dei primi problemi è lo scarso risultato in pieno campo, a causa dell'elevata competitività tra i microrganismi e a causa del fatto che è difficile avere effetti importanti quando si trattano piante adulte. Tale mancanza di effetti è facilmente spiegabile dalla difficoltà che i microrganismi introdotti avrebbero a colonizzare una rizosfera già ben colonizzata e stabile. La risposta immediata all'inoculazione del suolo con PGPR può variare ampiamente in relazione ai suoli, ai ceppi considerati, alla densità dell'inoculante e alla specie vegetale. In generale, dopo l'inoculazione, la popolazione introdotta cala rapidamente e progressivamente e può accadere che il numero di PGPR che colonizzano le radici non sia sufficiente a ottenere i risultati desiderati. In altri casi, i microrganismi introdotti non riescono a trovare una nicchia ecologica libera nel suolo. I ceppi utilizzati devono, inoltre, mantenere stabilmente i caratteri desiderati ed essere

capaci di superare gli stress legati ai processi di concentrazione e stabilizzazione durante i processi produttivi. Gli inoculanti possono essere applicati in pieno campo in vario modo:

- ricoprendo il seme al momento della semina;
- distribuendo il prodotto direttamente nei solchi al momento della semina;
- utilizzando seme confettato, cioè ricoperto da matrici hanno incluso i microrganismi PGPR. Tale tecnica offre innegabili vantaggi ma non ha avuto una grande diffusione a causa dell'elevato costo.

L'inoculazione del seme è la tecnica più diffusa al mondo, poiché consente all'agricoltore di seminare e inoculare nello stesso tempo, risparmiando così tempo e denaro. Soluzioni alternative sono quelle che utilizzano i polimeri, in particolare alginato, per incapsulare le cellule microbiche proteggendole dagli stress ambientali e consentendone il rilascio graduale, ma in grande quantità, nel suolo. L'ottenimento di sferule di alginato è relativamente semplice a partire da brodoculture e le *micro-beads* risultanti possono essere essiccate e conservate a temperatura ambiente. Recentemente sono comparse sul mercato grandi quantità di alginato prodotto da batteri e il conseguente abbassamento del prezzo ha reso più attrattiva questa tecnologia. Preparazioni a base di alginato sono state proposte per vari microrganismi, tra i quali *Pseudomonas fluorescens* come agente di biocontrollo o *Azospirillum brasilense* come biofertilizzante.

### **1.8. Scopo della tesi**

Lo scopo di questa ricerca è stato la valutazione, sia in ambiente controllato che in pieno campo, dell'effetto di diversi ammendanti organici e dell'inoculazione di batteri promotori della crescita/induttori di resistenza (PGPR/ISR), sulla resa e qualità degli oli essenziali estratti da due colture officinali, *Thymus vulgaris* L. e *Origanum vulgare* L., al fine di potenziare la produzione e l'attività biocida dei suddetti oli nei confronti di batteri e funghi patogeni delle principali colture ortive.

## **Capitolo 2      Materiali e metodi**

### **2.1.      Prova in ambiente controllato**

#### **2.1.1      Prova ammendanti**

La prova è stata condotta utilizzando tre diversi tipi di ammendanti:

- Compost, originato dalla frazione organica dei residui solidi urbani (F.O.R.S.U.) commercializzato dalla ditta GESENU di Perugia.
- Farina di semi di *Brassica carinata*
- Farina di semi di girasole

Questi ultimi due ammendanti sono prodotti di scarto ottenuti dal processo industriale di estrazione meccanica e chimica degli oli di semi.

##### **2.1.1.a. Allevamento delle piantine**

Le prove sono state condotte presso l' Azienda Sperimentale di Battipaglia (SA) del CRA – Centro di Ricerca per l'Orticoltura. Il timo e l'origano sono stati seminati in piastre ELISA i cui pozzetti sono stati riempiti con terriccio sterile; in ogni pozzetto è stato riposto un solo seme. Periodicamente si è provveduto ad irrigare con acqua di rubinetto. Successivamente, le giovani piantine ottenute, provviste di un paio di internodi fogliari, sono state trapiantate in vasi del diametro di 12 cm contenenti un substrato di torba e agriperlite in rapporto 1:1 (v/v) e ammendati con:

1. Compost da F.O.R.S.U..
2. Farina di semi di *Brassica carinata*
3. Farina di semi di girasole

### 2.1.1.b. Somministrazione degli ammendanti

Ogni ammendante è stato impiegato in una dose pari a  $30 \text{ t ha}^{-1}$  di sostanza secca (s.s.), nel caso del compost e di  $3 \text{ t ha}^{-1}$  di s.s. nel caso delle farine di disoleazione. Gli ammendanti sono stati mescolati con la torba e l'agriperlite, inumiditi e lasciati riposare per una settimana prima del trapianto del timo e dell'origano. Come controllo è stata impiegata una tesi irrigata con una soluzione minerale la cui composizione è descritta in tabella 1.

**Tabella 1.** Composizione della soluzione minerale

<b>Microelementi</b>	<b>Concentrazione (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
$\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.03
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.09
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.24
$\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$	2.70
$\text{BH}_3\text{O}_3$	13.8
EDTA-Fe	14.0
<b>Macroelementi</b>	<b>Concentrazione (mM)</b>
$\text{MgSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$	0.30
$\text{K}_2\text{SO}_4$	0.90
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.15
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.10

La prova è stata condotta in camera di crescita in condizioni di 16 ore di luce e 8 ore di buio, come fotoperiodo, con temperatura costante di  $24\text{-}25^\circ\text{C}$  e umidità del 70%

### 2.1.2 Prova con batteri PGPR/ISR

#### 2.1.2.a Allevamento delle piantine

Dopo tre settimane dalla semina, le giovani piantine alte circa 5 cm sono state trapiantate su un substrato di torba e agriperlite in rapporto 1:1 sterilizzato in autoclave a  $121^\circ\text{C}$  per un'ora. In ogni vaso, del diametro di 12 cm, sono state

trapiantate 4 piantine; per ogni trattamento (inoculo), sono stati utilizzati 5 vasi così da ottenere complessivamente 20 piantine per ogni trattamento.

Le prove sono state condotte in camera di crescita in condizioni di 16 ore di luce e 8 ore di buio, come fotoperiodo, con temperatura costante di 24-25 °C e il 70% di umidità. Le piante sono state irrigate 2 volte a settimana, con una soluzione minerale la cui composizione è descritta in tabella 1. L'inoculo batterico preparato è stato dato alle piante, una volta alla settimana, per l'intera durata della prova (12 settimane), con un volume di inoculo pari a 10 ml per pianta.

#### **2.1.2.b. Moltiplicazione e inoculazione dei batteri**

I ceppi batterici PGPR/ISR impiegati sono stati prescelti nell'ambito di una collezione presente presso la Sede di Battipaglia del CRA - Centro di Ricerca per l'Orticoltura. In particolare, sono stati prescelti cinque ceppi batterici che già avevano mostrato un'attività di promozione di crescita su altre colture ortive, quali pomodoro, patata e tabacco (Zaccardelli *et al.*, 2007) (Tabella 2).

**Tabella 2.** Elenco dei ceppi PGPR/ISR selezionati

<b>Ceppo</b>	<b>Specie</b>
7 III BAC	<i>Bacillus cereus</i>
21 V BAC	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
ANT RHIZ B	<i>Bacillus subtilis</i>
CEPPO 13	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
CEPPO 16	<i>Pseudomonas putida</i>

Ciascun ceppo è stato moltiplicato su un appropriato mezzo di crescita e precisamente: Nutrient Agar Glucosio (NAG) per i ceppi 21 V BAC, ANT RHIZ B e 7 III BAC; King B medium (KB) per il CEPPO 13 e il CEPPO 16. L'incubazione è avvenuta in termostato a 28°C per overnight.

Attraverso l'impiego della camera di conta di Burkner è stato possibile eseguire la conta diretta delle cellule batteriche contenute in un volume noto di sospensione al fine di definire, per ogni ceppo, l'esatto quantitativo di pellet batterico da impiegare per l'ottenimento di una sospensione omogenea alla concentrazione di circa  $1 \times 10^8$  CFU/ml (tabella 3).

**Tabella 3.** Pellet batterico utilizzato per la preparazione dell'inoculo

<b>Ceppo</b>	<b>Quantità (g) /100 ml</b>
21 BAC	0,10
7 III BAC	0,05
ANT RHIZ B	0,25
CEPPO 13	0,10
CEPPO 16	0,12

### **2.1.3 Rilievi eseguiti sulle piante di timo e origano**

Sulle piante alla raccolta, avvenuta dopo 12 settimane dal trapianto, sono stati eseguiti i seguenti rilievi biometrici:

- Numero degli steli principali;
- Lunghezza degli steli principali;
- Numero degli steli secondari;
- Lunghezza degli steli secondari;
- Numero di foglie;
- Peso fresco parte aerea;
- Peso fresco radici;
- Peso secco parte aerea;
- Peso secco radici;
- Area fogliare;
- Numero di tricomi ghiandolari;
- Resa dell'olio essenziale estratto.

L'area fogliare e il numero di tricomi ghiandolari sono stati misurati mediante l'ausilio di uno stereo-microscopio (Motic SMZ 165), equipaggiato con fotocamera (Moticam M-C camera 2500) e software (Motic images plus versione 2.0 ML) per l'elaborazione delle immagini. È stato valutato il numero di tricomi ghiandolari sia sulla pagina superiore che su quella inferiore. Per ogni trattamento sono state analizzate dieci foglioline prelevate da punti diversi delle piante.

## **2.2. Valutazione dell'attività ormono-simile dei ceppi 7III BAC e CEPP016**

### **2.2.1 Preparazione dei filtrati culturali**

Per determinare l'attività auxino-simile dei ceppi 7III BAC e CEPP016 impiegati come inoculi rispettivamente su origano e timo, i ceppi batterici sono stati fatti crescere per 5 giorni in LB liquido a 28 °C in agitazione a 150 rpm e il terreno di coltura è stato quindi filtrato mediante filtri da 0,22µm. Sono state preparate diluizioni seriali per ognuno dei due filtrati culturali alle concentrazioni del 100%, 10% e 1%. Come controllo è stata usata acqua bidistillata sterile. Come standard per l'attività auxinica è stato usato l'acido idol-3-butirrico (IBA) alle concentrazioni di  $10^{-3}$  e  $10^{-7}$

### **2.2.2 Biosaggio dell'attività auxino-simile**

Semi di *Phaseolus vulgaris* sono stati disinfettati in superficie e fatti crescere per 14 giorni in agriperlite umida. Le giovani piantine sono state tagliate a 15 cm dal primo nodo fogliare e ne sono stati rimossi i cotiledoni, ove ancora presenti. Ogni piantina, così preparata, è stata trasferita in tubi per microbiologia contenenti circa 20 ml della soluzione di trattamento (indicate nel paragrafo precedente). Per ogni trattamento sono state impiegate dieci piantine. Dopo essere rimaste in contatto con le varie soluzioni a temperatura ambiente overnight, le piantine sono state trapiantate in vaschette contenenti agriperlite umida e sigillate con pellicola trasparente per evitare evaporazione. Dopo 11 giorni le piantine sono state

analizzate per il numero, la lunghezza e la percentuale di sostanza secca delle radici

### **2.3. Prove in campo**

In base ai risultati ottenuti con i test condotti in ambiente controllato nel primo e nel secondo anno, per il timo sono state allestite prove di coltivazione in pieno campo.

#### **2.3.1. Prova ammendanti**

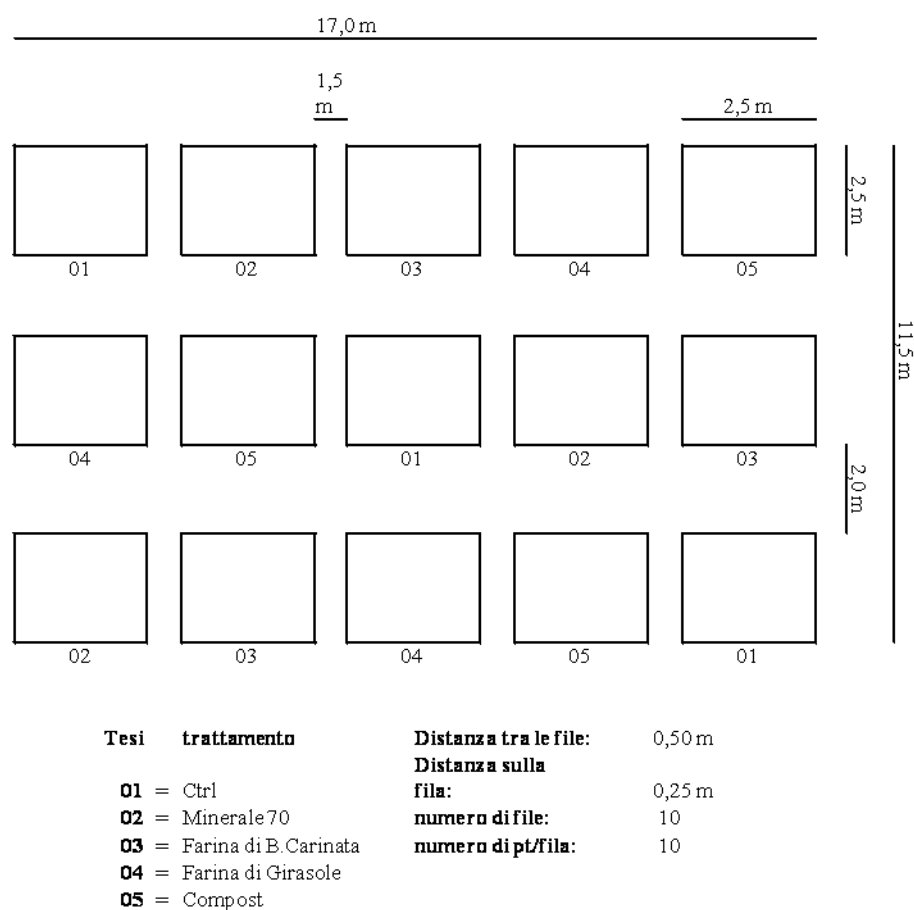
Le piantine di timo sono state trapiantate in pieno campo presso l'Azienda Sperimentale di Battipaglia del CRA-ORT il 15 maggio del 2010. La prova è stata condotta secondo uno schema sperimentale a blocchi randomizzati con tre repliche, con cinque tesi corrispondenti ad altrettanti trattamenti (figura. 7).

##### **2.3.1.a Distribuzione degli ammendanti**

Le tesi sono state trattate nel seguente modo: nella tesi 01, indicata come controllo, non è stato eseguito alcun trattamento; nella tesi 02, le piante sono state concimate con una dose di azoto minerale pari a 70 U/ha, suddividendo la concimazione azotata come segue: 40 % al trapianto, sotto forma di solfato ammonico e 60 % in copertura, come nitrato ammonico, somministrato in tre volte a distanza di circa 20 giorni l'uno dall'altro; le tesi 03 e 04 sono state ammendate, rispettivamente, con 3 t ha<sup>-1</sup> di farina di semi di *Brassica carinata* e 3 t ha<sup>-1</sup> di farina di semi di girasole, dosi equivalenti ad una quantità di azoto pari a 150 U ha<sup>-1</sup> a tesi 05, infine, è stata ammendata con 15 t ha<sup>-1</sup> di compost da F.O.R.S.U. prodotto dalla Ditta GESENU di Perugia. Questa dose di compost conteneva una quantità di azoto pari a 300 U ha<sup>-1</sup>. Il trapianto del timo è stato eseguito dopo una settimana dalla concimazione di fondo. Le piante sono state poste ad una distanza di 25 cm sulla fila e di 50 cm tra le file. Per ogni fila sono state trapiantate 10 piantine per un totale di 50 per parcella. Per quanto riguarda



l'irrigazione, considerata la rusticità della specie in oggetto e il suo basso fabbisogno di acqua, si è intervenuti solo in caso di effettiva necessità (interventi di soccorso).

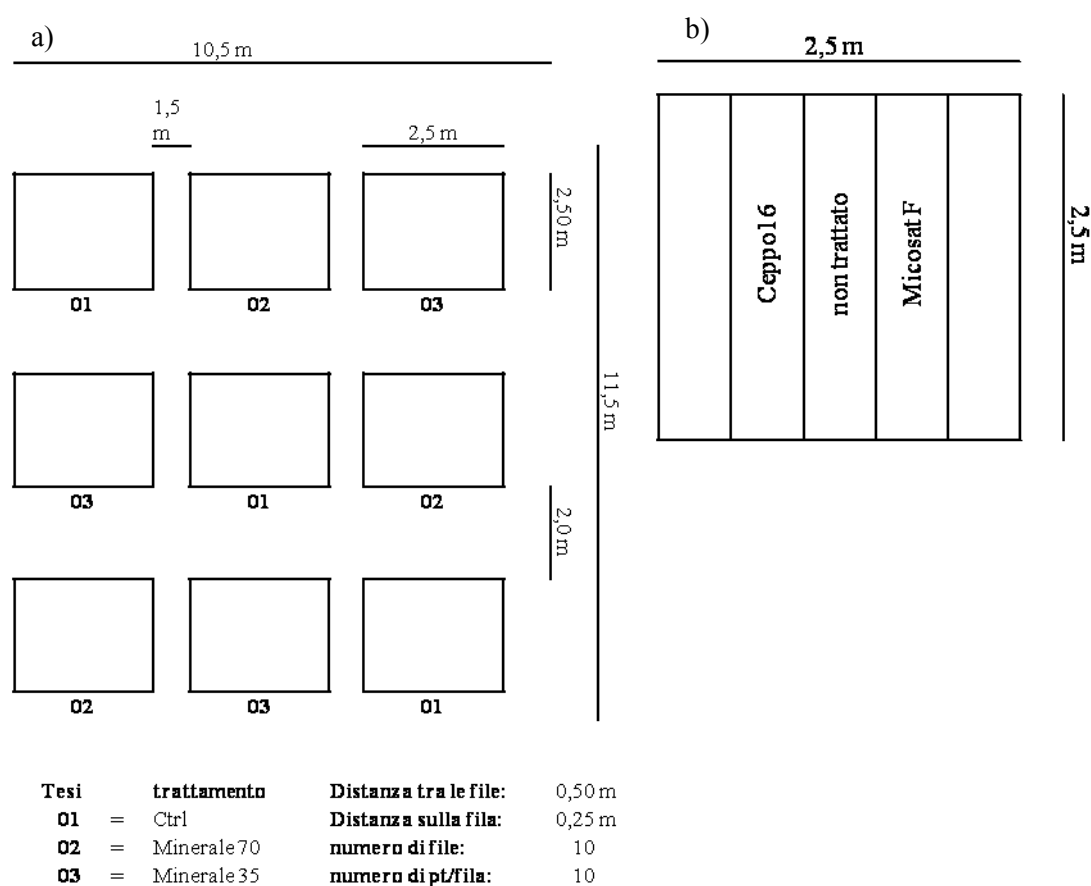


**Figura 7.** Schema di campo impiegato per la conduzione della prova ammendanti in pieno campo

### 2.3.2 Prova con batteri PGPR/ISR

Come nella prova con gli ammendanti le piantine di timo sono state trapiantate in campo il 15 maggio 2010. Lo schema sperimentale impiegato è stato uno split-plot con tre repliche, dove le tre differenti concimazioni sono state poste nelle parcelle intere mentre i ceppi PGPR/ISR e i formulati microbici commerciali sono stati posti nelle sub-parcelle. Nello specifico, nella tesi 01 non è stato fatto nessun tipo di concimazione; la tesi 02 e la tesi 03 sono state fertilizzate rispettivamente

con 70U/ha e 35 U/ha di azoto. Come inoculanti testato sono stati impiegati il ceppo 16 di *Pseudomonas putida* e il preparato commerciale Micosat F (a base di e ceppi batterici tra cui *Pseudomonas* spp. SN02, *Pseudomonas borealis* PA37, *Pseudomonas* spp. PM46). In figura 8 viene riportato lo schema sperimentale impiegato in pieno campo.



**Figura 8. a)** schema di campo impiegato nella prova PGPR; **b)** distribuzione degli inoculi nelle singole parcelle

### 2.3.2.a. Preparazione e distribuzione degli inoculi.

Gli inoculi sono stati somministrati a cadenza settimanale e fino ad una settimana prima della raccolta, per un totale di 9 trattamenti. Sia il preparato commerciale che il ceppo PGPR/ISR della nostra collezione, sono stati opportunamente disciolti in acqua di pozzo e distribuiti, quindi, alle piante. In particolare il CEPPO 16 dopo essere stato moltiplicato per 24 ore in termostato a 28°C, è stato disciolto in acqua di pozzo fino ad ottenere una concentrazione dell'ordine di  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>;

il formulato commerciale Micosat F, invece, è stato impiegato ad una concentrazione  $6\text{kg ha}^{-1}$ , così come indicato dalla ditta produttrice.

#### **2.4. Rilievi eseguiti sulle piante**

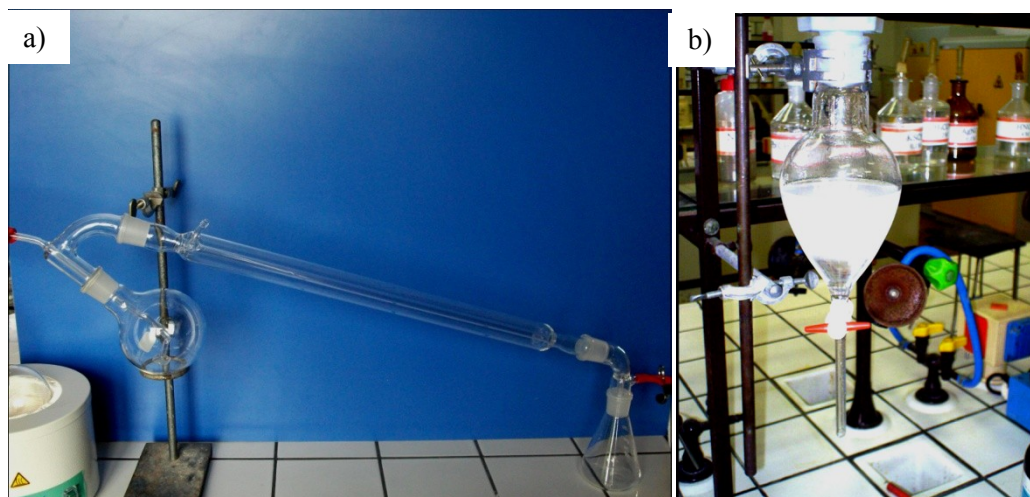
Alla raccolta, avvenuta dopo 10 settimane dal trapianto, sono stati eseguiti sulle piante i seguenti rilievi biometrici:

- Peso fresco parte aerea;
- Peso secco parte aerea;
- Larghezza e altezza cespo
- Numero di piante fiorite
- Resa dell'olio essenziale estratto.

#### **2.5. Estrazione degli oli essenziali**

L'olio essenziale è stato estratto mediante distillazione in corrente di vapore utilizzando un distillatore di Clevenger. Ogni campione è stato finemente sminuzzato e posto in un pallone da 500 ml. All'interno del pallone è stata creata una corrente di vapore tale da permettere il passaggio dell'olio dalle foglie alla soluzione aeriforme. Quest'ultima è stata condensata, successivamente, in un refrigeratore e raccolta in una beuta (figura 9a). Ogni distillazione ha avuto una durata di 2 h e 30', fino alla raccolta di circa 150 ml di distillato.

L'olio essenziale contenuto nel distillato è stato separato successivamente con etere dietilico mediante triplo abbattimento in imbuto separatore (**figura 9b**).



**Figura 9. a)** Distillatore in corrente di vapore, **b)** imbuto separatore

Passato dalla fase polare a quella apolare l'olio, è stato trattato con fosfato di sodio per eliminare le rimanenti tracce di acqua ancora presenti. Una volta allontanato il sale, la soluzione olio-etere dietilico è stata concentrata mediante l'impiego di un evaporatore rotante (laborota 4000 eco) (Figura 10).



**Figura 10:** Evaporatore rotante

## **2.6. Analisi GC/MS degli oli essenziali**

Le analisi sono state eseguite con uno strumento GC/MS della Agilent 7890A equipaggiato di una colonna di silice fusa Hp-5MS (fenil metil silicone 5%, 30 m x 0,25 mm ID, spessore del film 0.25µm) e di un Mass Selective Detector 5975A (MSD) , usando le seguenti condizioni analitiche:

- temperatura iniettore : 250°C;
- programma di temperatura del forno da 50°C (10 min) a 230°C, con un incremento pari a 5°C min<sup>-1</sup>;
- gas di trasporto: Elio, con flusso di 1,2 ml min<sup>-1</sup>;
- rapporto di split: 1:50;
- energia di ionizzazione: 70 eV
- volume di iniezione: 1 µl di una soluzione in etere dietilico 1:1000.
- solvent delay: 3 min

I costituenti dell'olio essenziale sono stati identificati dai loro indici di ritenzione per confronto dei loro spettri di massa con quelli riportati in letteratura (Adams 1995) e per confronto dei loro spettri di massa con quelli registrati nella libreria (NIST) in dotazione al computer del GC/MS. Inoltre, quando possibile, è stato eseguito un confronto con alcuni standard (Sigma Aldrich srl) analizzati sullo stesso strumento e alle stesse condizioni sperimentali.

## **2.7. Valutazione delle attività biocide degli oli estratti**

L'attività biocida degli oli estratti è stata valutata su batteri e funghi fitopatogeni.

Per la valutazione dell'attività biocida sui batteri fitopatogeni si è proceduto alla sospensione, nella stessa provetta, del pellet batterico e dell'olio essenziale in PBS (NaCl 8 g l<sup>-1</sup>, KCl 0,2 g l<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 2,68 g l<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g l<sup>-1</sup>, pH 7,4), fino ad ottenere una concentrazione batterica pari a 0,1 O.D. (ABS = 600 nm). Dopo incubazione a 28 °C overnight, 3 goccioline da 10 µl cadauna della miscela batterio/olio essenziale, sono state insemiante in capsule di Petri su opportuno substrato per valutare, entro 48 h, la crescita batterica.

Per i funghi, invece, tassellini di micelio fungino del diametro di 6 mm sono stati messi a contatto con diverse diluizioni degli oli essenziali e incubati a 25 °C per 24 h, al termine dei quali sono stati posti in capsule di Petri contenenti Potato Dextrose Agar (PDA), per valutarne l'eventuale inibizione di crescita dopo alcuni giorni di incubazione in termostato a 25 °C.

### 2.7.1 Batteri e funghi fitopatogeni e loro condizioni di crescita

Sono stati testati otto ceppi batterici e nove ceppi fungini, fitopatogeni delle principali colture ortive. Questi batteri e funghi provenivano dalla collezione presente presso la Sede di Battipaglia del CRA-ORT (tabella 4)

**Tabella 4.** batteri e funghi impiegati nei test di antibiosi

BATTERI	FUNGI
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>alfa alfa</i>	<i>Fusarium sambucinum</i>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	<i>Sclerotinia</i> sp.
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Alternaria</i> sp.
<i>Pectobacterium</i> . <i>carotovorum</i>	<i>Fusarium semitectum</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	<i>Verticillum</i> sp
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Pseudomonas</i> . <i>syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
/	<i>Fusarium solani</i>

Sia i batteri che i funghi sono stati allevati su appropriati mezzi di crescita. In particolare, tutti gli *Xanthomonas* e il *Pectobacterium* sono stati allevati su Nutrient Agar Glucose (NAG) mentre tutti gli *Pseudomonas* sono stati allevati su King B medium (KB). Tutti i funghi, invece, sono stati allevati su Potato Dextrose Agar (PDA).

### **2.7.2 Determinazione della Minimum Inhibitory Concentration (MIC)**

La MIC rappresenta la concentrazione più bassa di una sostanza in grado di inibire la crescita di un organismo. La determinazione della MIC è stata condotta allo stesso modo con cui è stata valutata l'attività biocida degli oli. Ogni ceppo batterico e ogni isolato fungino è stato messo a contatto, over-night, con concentrazioni crescenti di olio essenziale (dallo 0% all'1%); la mattina seguente è stato insemato per valutarne la crescita dopo incubazione in termostato.

### **2.8. Elaborazione statistica dei dati**

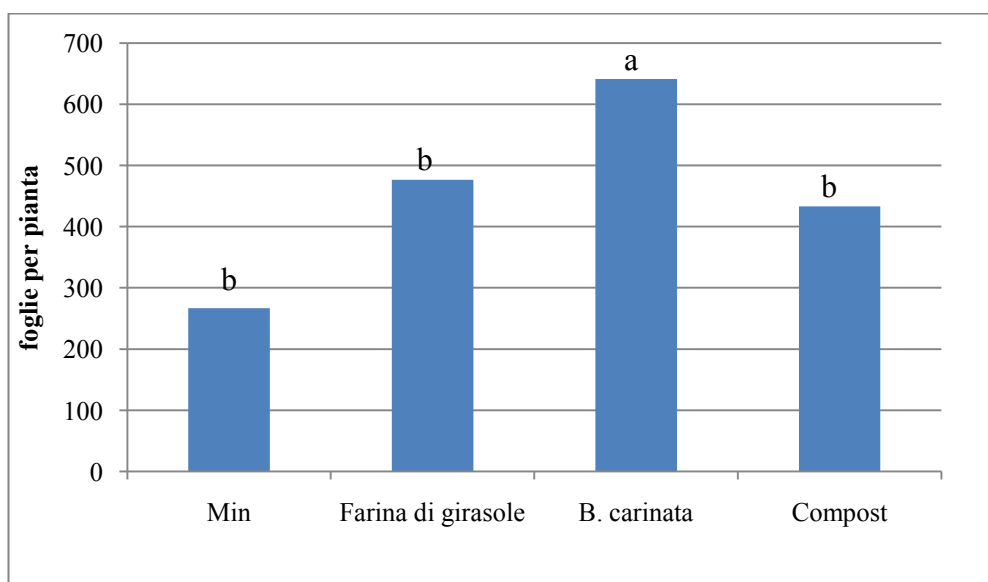
Tutti i dati sono stati elaborati statisticamente. In particolare, è stata eseguita l'analisi della varianza e le medie separate mediante il test di Duncan. Per le elaborazioni è stato utilizzato il software MSTAT-C.

## Capitolo 3      Risultati

### 3.1 Prova ammendanti in ambiente controllato

#### 3.1.1 Rilievi biometrici su timo

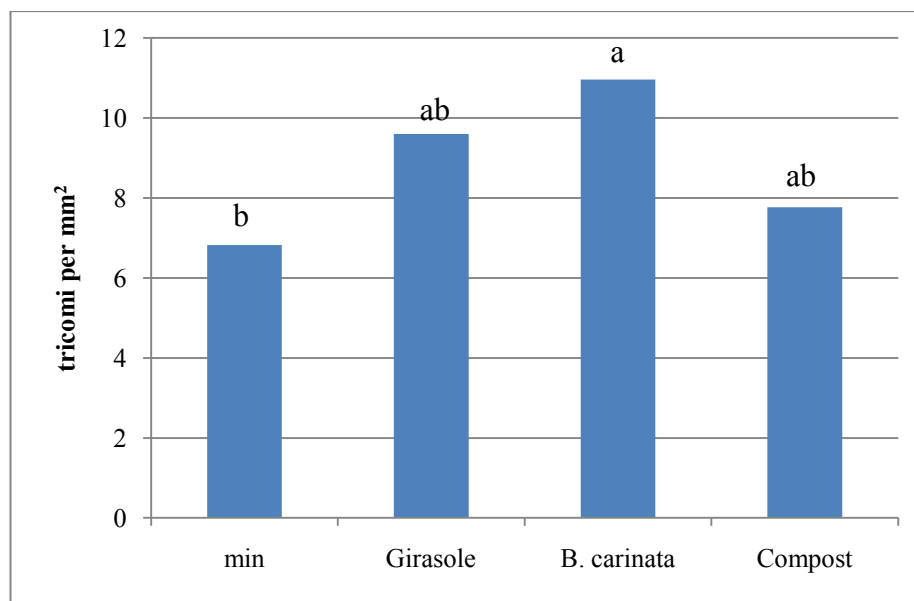
Dall'analisi dei rilievi biometrici eseguiti sulle piante di timo trattate con diversi ammendanti, emergono alcune differenze. In particolare, tutte le piante trattate avevano un numero di foglie superiore rispetto al controllo minerale. In dettaglio, le piante ammendate con farina di semi di *Brassica carinata* avevano un numero di foglie statisticamente superiore (641,3) non solo rispetto al controllo minerale (266,6) ma anche rispetto a tutti gli altri ammendanti (farina di semi di girasole 476,7; compost 433,3), come mostrato in figura 11.



**Figura 11.** Numero di foglie per pianta in *Thymus vulgaris* trattato con diversi ammendanti.

Anche per i rilievi inerenti il numero di tricomi per unità di superficie fogliare, sono state osservate differenze tra la tesi ammendata con farina di semi di *B. carinata* e tutti gli altri trattamenti. Infatti, come indicato in figura 12, le piante ammendate con farina di *B. carinata* hanno prodotto un numero di tricomi statisticamente superiore rispetto al controllo minerale, ma non statisticamente differente rispetto ai trattamenti con gli altri ammendanti.





**Figura 12.** Analisi del numero dei tricomi ghiandolari per mm<sup>2</sup> su piante di timo differenziate ammendate.

Anche per quanto riguarda la lunghezza degli steli principali, le piante ammendate con farina di *B. carinata* presentavano steli più lunghi rispetto al controllo minerale e rispetto a tutti gli altri trattamenti (tabella 5).

Dall'analisi del numero delle ramificazioni si è visto che le piante provenienti dalle tesi concimate con soluzione minerale, presentavano un maggior numero di ramificazioni per pianta (32,3) rispetto agli altri trattamenti. Le piante ammendate con compost, invece, hanno mostrato meno ramificazioni (14,7) come indicato nella tabella 5.

Ulteriori differenze sono state riscontrate per quanto riguarda il peso fresco delle piante. Infatti, come indicato in tabella 5, le piante che sono state ammendate con compost hanno mostrato un valore (0,8 g) più basso rispetto a tutti gli altri trattamenti.

Nessuna differenza, invece, è stata riscontrata per quanto riguarda la lunghezza degli steli principali, l'area fogliare e la sostanza secca.

**Tabella 5.** Principali rilievi biometrici eseguiti sulle piante di *Thymus vulgaris* differentemente ammendate

Trattamento	ramificazioni (n°)	lunghezza steli principali (cm)	peso fresco per pianta (g)	area fogliare (mm <sup>2</sup> )	sostanza secca (%)
<b>Min</b>	32,3 a	11,5 a	1,7 a	14,70 a	34,0 a
<b>Girasole</b>	21,7 b	15,5 a	1,4 a	14,63 a	34,8 a
<b><i>B. carinata</i></b>	25,9 b	15,2 a	1,8 a	13,27 a	40,2 a
<b>Compost</b>	14,7 b	19,4 b	0,8 b	12,16 a	34,1 a

p<0,05

### 3.1.2 Resa in olio essenziale di timo

I dati inerenti l'estrazione degli oli essenziali hanno evidenziato notevole differenze tra i trattamenti (tabella 6). In particolare, tutte le piante trattate con *B. carinata*, farina girasole e compost hanno fornito una resa in olio essenziale superiore rispetto al controllo minerale. Nello specifico, le piante allevate su terreno ammendato con farine di semi di *B. carinata* hanno dato una resa in olio essenziale superiore rispetto al controllo minerale (rispettivamente 0,95% e 0,71%) e rispetto a tutti gli altri trattamenti.

**Tabella 6.** Resa in olio essenziale estratto da piante di timo coltivate su substrati trattati con i diversi ammendanti

Trattamento	Resa in olio essenziale (%)
<b>Minerale</b>	0,71
<b>Farina di girasole</b>	0,54
<b>Farina di <i>B. carinata</i></b>	0,95
<b>Compost</b>	0,29

### 3.1.3 Test di attività biocida dell'olio di timo

Gli oli essenziali estratti dalle piante di timo trattate con i diversi ammendanti sono stati testati a due diverse concentrazioni (0,1 e 0,01%) per valutare le loro proprietà biocide nei confronti dei principali batteri e funghi fitopatogeni di specie ortive. Alla diluizione dello 0,1%, tutti gli oli hanno mostrato una buona attività biocida verso i batteri fitopatogeni.

In particolare, gli oli estratti dalle piante allevate su terreni ammendati con compost e con farina di semi di *B. carinata*, hanno inibito tutti i batteri fitopatogeni, mentre gli oli estratti dalle piante allevate su substrato trattato con farina di semi di girasole e con concime minerale, hanno inibito solo le xanthomonadi, ad eccezione di *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, non inibito dall'olio estratto dalla tesi minerale e impiegato alla concentrazione dello 0,1 % (tabella 7). Alla concentrazione dello 0,01%, gli oli che hanno mostrato la migliore attività antibatterica sono stati quelli delle tesi ammendate con compost, che ha inibito tutte le xanthomonadi e *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, e quello estratto dalla tesi con farina di *B. carinata*, che ha inibito *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e tutte le xanthomonadi, ad eccezione di *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (tabella 7).

Anche verso i funghi fitopatogeni, gli oli estratti dalle piante ammendate con farina di *B. carinata* e con compost hanno mostrato la migliore attività biocida. Infatti, alla diluizione dello 0,1%, su otto isolati fungini testati, sei sono stati inibiti dall'olio estratto dalle tesi ammendate con *B. carinata* e cinque dall'olio estratto dalle tesi ammendate con compost. Invece, l'olio estratto da piante ammendate con farine di semi di girasole, ha inibito la crescita solo di due funghi (*Sclerotinia* sp. e *Botrytis* sp.), mentre nessun fungo è stato inibito dall'olio estratto dalle piante concimate con soluzione minerale. Alla diluizione dello 0,01% nessun olio è stato in grado di inibire la crescita dei nove isolati fungini testati (tabella 7).

**Tabella 7.** Inibizione di crescita di batteri e funghi fitopatogeni trattati con gli oli essenziali estratti dalle piante di *Thymus vulgaris* diversamente ammendate.

Batteri	Minerale		Girasole		<i>B. carinata</i>		Compost		Ctrl
	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	
<i>X. a. pv. alfa alfa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>X. c. pv. phaseoli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>X. c. pv. vesicatoria</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>P. carotovorum</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	+
<i>P. s. pv. phaseolicola</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>P. s. pv. syringae</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>P. s. pv. tomato</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	+

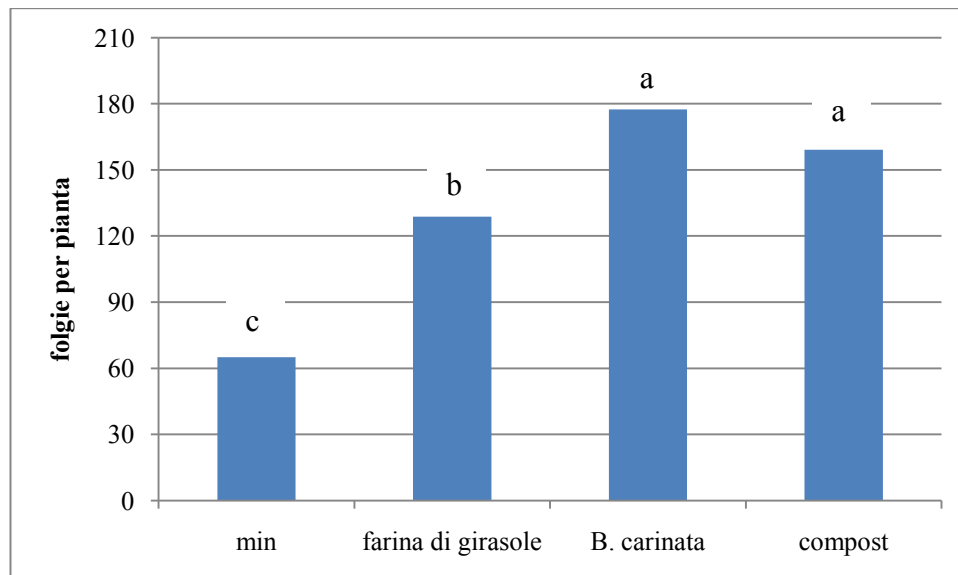
  

Funghi	Minerale		Girasole		<i>B. carinata</i>		Compost		Ctrl
	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	
<i>F. sambucinum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>F. semitectum</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>F. oxysporum</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>Sclerotinia sp.</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	+
<i>Botrytis sp.</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	+
<i>Alternaria sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. solani</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>F. solani</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Verticillium sp.</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	+

+ = crescita, - = inibizione

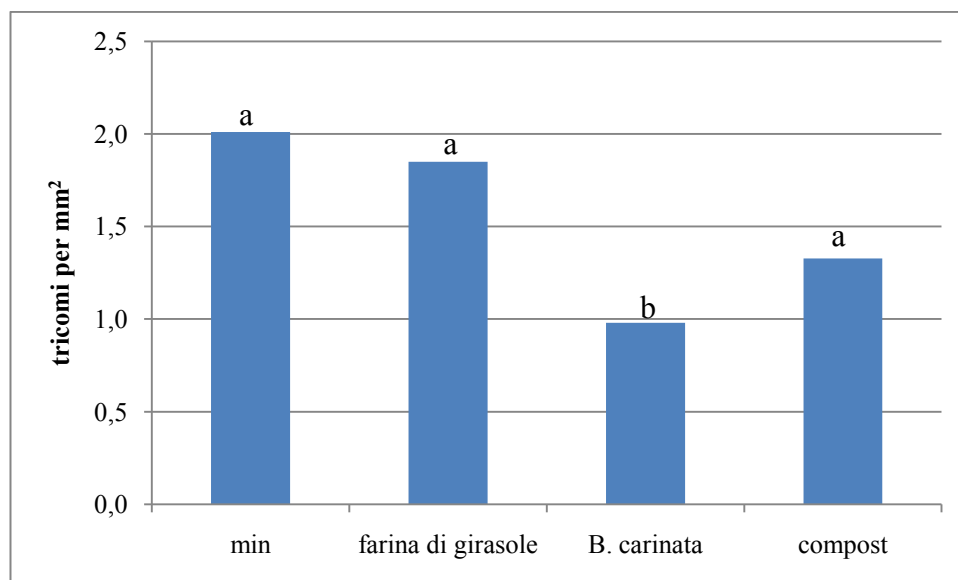
### 3.1.4 Rilievi biometrici su origano

L'analisi dei rilievi biometrici eseguiti sulle piante di origano, trattate con i diversi ammendanti, evidenzia alcune differenze. In particolare, per quanto riguarda il numero di foglie, è stato osservato come tutte le piante trattate con i diversi ammendanti presentavano un numero superiore rispetto al controllo minerale. Per la precisione, le piante ammendate con farina di *B. carinata* e con compost presentavano un numero di foglie superiore (rispettivamente 177,4 e 159,1) non solo rispetto al controllo minerale (65,1) ma anche rispetto alla tesi ammendata con farina di girasole (128,8) (figura 13).



**Figura 13.** Numero di foglie per pianta in *Origanum vulgare* differientemente ammendato.

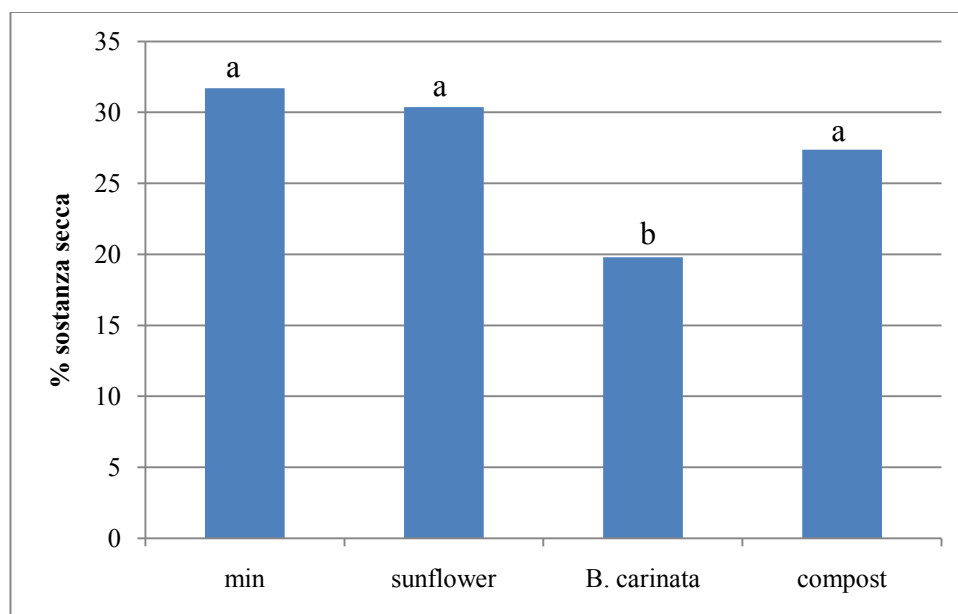
Anche per i rilievi eseguiti sul numero di tricomi per unità di superficie fogliare, sono state osservate differenze tra le tesi ammendate con farine di *B. carinata* e tutti gli altri trattamenti. Infatti, come indicato in figura 14, le piante ammendate con la farina di *B. carinata* hanno prodotto un numero di tricomi statisticamente più basso (1,0 tricomi mm<sup>-2</sup>) rispetto al controllo minerale (2,0 tricomi mm<sup>-2</sup>) e a tutti gli altri trattamenti.



**Figura 14.** Numero di tricomi per unità di superficie su foglie di *Origanum vulgare* differientemente ammendato.

Inoltre, è stato osservato come le piante ammendate con farina di *B. carinata* avevano un peso secco inferiore rispetto a tutti gli altri trattamenti.

Per tutti gli altri rilievi biometrici eseguiti, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i diversi trattamenti (figura 15)



**Figura 15.** Sostanza secca delle piante in piante di *Origanum vulgare* differientemente ammendate

### 3.1.5 Resa in olio essenziale di origano

Le rese in olio essenziale sono risultate molto diverse tra le diverse tesi (tabella 9). In particolare, le piante ammendate con farina di *B. carinata* hanno dato una resa superiore rispetto al controllo minerale (rispettivamente 2,14% e 0,83%) e rispetto a tutti gli altri ammendamenti. Invece, le piante ammendate con farina di girasole hanno fornito la resa più bassa (0,6%) (tabella 9).

**Tabella 9.** Resa in olio essenziale estratto da piante di timo differentemente ammendate

Trattamento	resa olio essenziale (%)
Minerale	0,83
Farina di Girasole	0,62
Farina di <i>B. carinata</i>	2,14
Compost	1,13

### 3.1.6 Test di attività biocida dell'olio di origano

Anche gli oli estratti dalle piante di origano, così come quelli estratti dalle piante di timo, sono stati testati a due diverse concentrazioni (0,1 e 0,01%) per valutarne le proprietà biocide verso i batteri e funghi fitopatogeni.

Alla diluizione dello 0,1%, tutti gli oli hanno mostrato una eccellente attività biocida verso i batteri. In particolare, gli oli estratti dalle piante trattate con compost, con farina di *B. carinata* e con soluzione minerale, hanno mostrato inibizione verso tutti i batteri fitopatogeni testati. Invece, gli oli estratti dalle piante ammendate con farina di girasole, hanno inibito solo alcuni dei batteri testati (tutte le xanthomonadi e il *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) (tabella 10).

Alla diluizione dello 0,01%, gli oli che hanno mostrato la migliore attività antibatterica sono stati quello estratti dalle piante delle tesi ammendate con farina di *B. carinata*, che ha inibito tutti i batteri fatta eccezione per *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, e quello estratto dalle piante delle tesi ammendate con compost, che ha inibito tutti i batteri fatta eccezione per *Pectobacterium*

*carotovorum* subsp. *carotovorum* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (tabella 10). Gli oli estratti dalle piante trattate con soluzione minerale e con farina di girasole hanno mostrato un'attività battericida più ridotta, avendo inibito solo alcuni batteri alla diluizione più spinta (tabella 10).

Anche verso i funghi fitopatogeni, gli oli estratti dalle piante ammendate con farina di *B. carinata* hanno mostrato una più spiccata attività biocida. Infatti, alla concentrazione dello 0,1%, l'olio estratto da piante ammendate con farina *B. carinata* ha inibito la crescita di tutti i funghi fitopatogeni fatta eccezione per *Fusarium sambucinum* e *Rhizoctonia solani*. Gli oli estratti da piante ammendate con compost e da piante trattate con concime minerale, hanno inibito la crescita di sei dei nove funghi fitopatogeni testati (tabella 10). Sempre alla concentrazione dello 0,1 %, l'olio estratto dalle piante ammendate con farina di girasole non ha mostrato alcuna attività fungicida.

Alla concentrazione dello 0,01%, nessun olio è stato in grado di inibire la crescita dei nove isolati fungini testati



**Tabella 10.** Inibizione di crescita di batteri e funghi fitopatogeni trattati con oli essenziali estratti dalle piante di *Origanum vulgare* diversamente ammendate.

Batteri	Minerale		Girasole		<i>B. carinata</i>		Compost		Ctrl
	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	
<i>X. a. pv. alfa alfa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>X. c. pv. phaseoli</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>X. c. pv. vesicatoria</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>P. caratovorum</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>P. s. pv. phaseolicola</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>P. s. pv. syringae</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>P. s. pv. tomato</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+

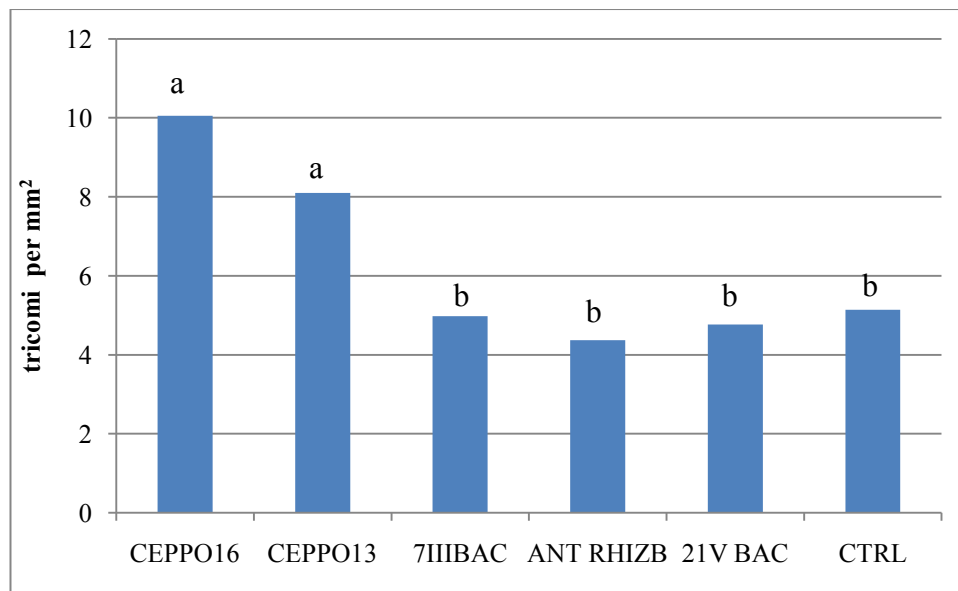
Funghi	Minerale		Girasole		<i>B. carinata</i>		Compost		Ctrl
	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	
<i>F. sambucinum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>F. semitectum</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+
<i>F. oxysporum</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+
<i>Sclerotinia</i> sp.	+	-	+	+	+	-	+	-	+
<i>Botrytis</i> sp.	+	-	+	+	+	-	+	-	+
<i>Alternaria</i> sp.	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>R. solani</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>F. solani</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>Verticillium</i> sp.	+	-	+	+	+	-	+	-	+

+ = crescita, - = inibizione

### 3.2 Prova PGPR in ambiente controllato

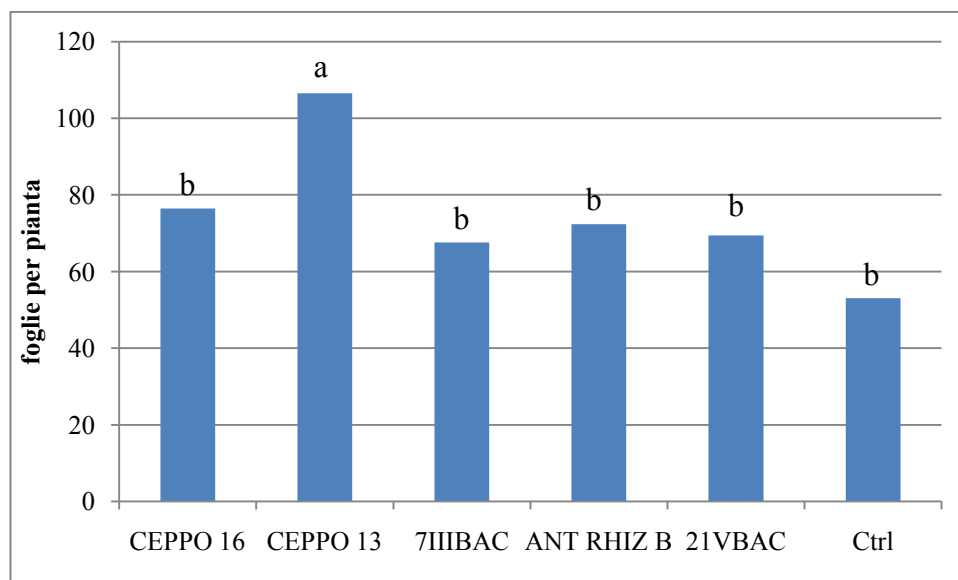
#### 3.2.1 Rilievi biometrici su timo

Dall'analisi dei rilievi eseguiti sulla prova di inoculazione delle piante di timo con diversi batteri PGPR/ISR, sono state osservate alcune differenze. In particolare, per quanto riguarda il numero di tricomi ghiandolari sulle foglie, le piante di timo inoculate con il CEPPO 16 di *Pseudomonas putida* e con il CEPPO 13 di *Pseudomonas fluorescens*, presentavano un numero di tricomi ghiandolari superiore (rispettivamente 10 e 8 tricomi mm<sup>-2</sup>) rispetto al controllo non inoculato (5 tricomi mm<sup>-2</sup>) e anche rispetto agli altri ceppi PGPR/ISR utilizzati (figura 16).



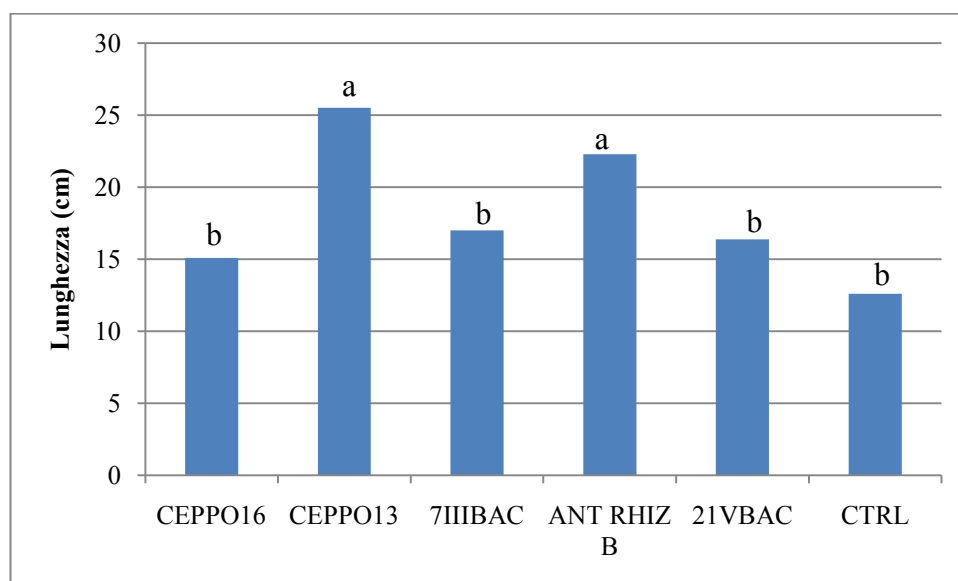
**Figura 16.** Numero di tricomi fogliari in piante di *Thymus vulgaris* inoculate con diversi ceppi PGPR/ISR

Differenze sono state osservate anche per il numero di foglie per pianta. Infatti, le piante che sono state inoculate con il CEPPO 13 (*P. fluorescens*) hanno prodotto un maggior numero di foglie rispetto al controllo non inoculato e agli altri ceppi impiegati (figura 17).



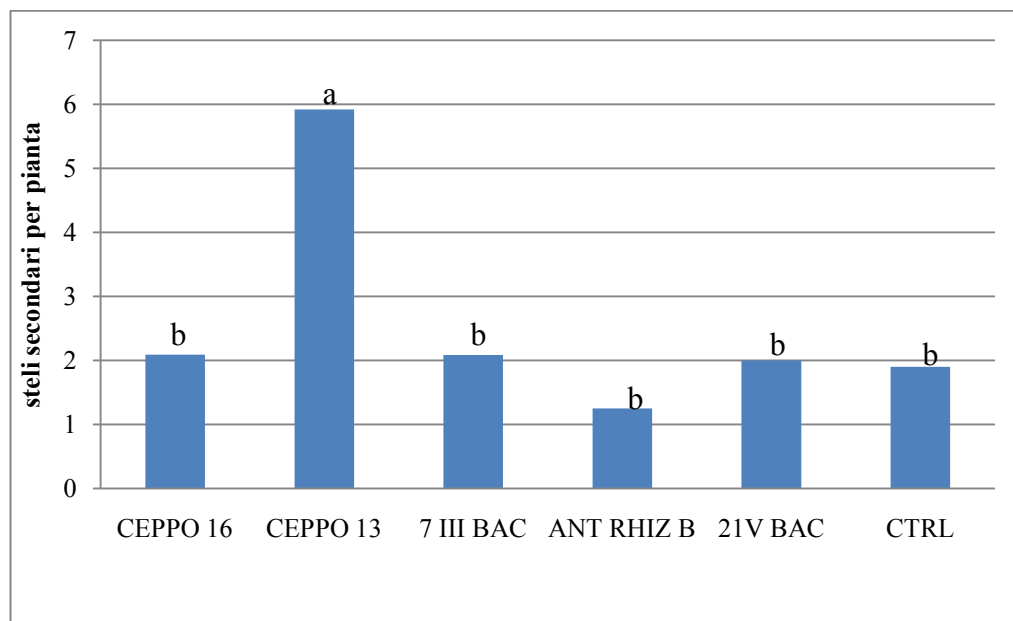
**Figura 17.** Numero di foglie in piante di *Thymus vulgaris* inoculate con diversi ceppi PGPR/ISR

Anche per la lunghezza degli steli principali, le piante inoculate con il CEPPO 13 hanno mostrato valori superiori (circa 25 cm) rispetto al controllo non inoculato (circa 12 cm), come evidenziato in figura 18. Anche il ceppo ANT RHIZ B di *Bacillus subtilis*, ha determinato valori statisticamente differenti per la lunghezza degli steli principali (circa 23 cm) rispetto al controllo e agli altri ceppi inoculati (figura 18)



**Figura 18.** Lunghezza degli steli principali delle piante di timo inoculate con i ceppi PGPR/ISR.

Le piante inoculate con il CEPPO 13, inoltre, hanno determinato un numero di steli secondari (circa 6 steli/pianta) superiore rispetto al controllo non inoculato (2 steli/pianta) e rispetto alle piante inoculate con gli altri ceppi batterici (figura 19).



**Figura 19.** Numero di steli secondari in piante di *Origanum vulgare* inoculate con diversi ceppi PGPR/ISR.

### 3.2.2 Resa in olio essenziale di timo

Le rese di estrazione degli oli essenziali ottenute (tabella 11) evidenziano come le piante inoculate con il CEPPO 13 di *Pseudomonas fluorescens*, abbiano dato la resa più bassa in olio essenziale (0,43%), sia rispetto al controllo non inoculato (0,93%) che rispetto alla resa ottenuta inoculando gli altri ceppi. La resa maggiore invece, è stata ottenuta inoculando il CEPPO 16 di *Pseudomonas putida* (1,17%).

**Tabella 11.** Resa in olio essenziale estratto da piante di timo inoculate con diversi ceppi PGPR/ISR

Ceppi	Resa olio (%)
CTRL	0,93
ANT RHIZ B	0,68
21 V BAC	0,67
7 III BAC	0,59
CEPPO 16	1,17
CEPPO 13	0,43

### 3.2.3 Test di attività biocida dell'olio di timo

Gli oli essenziali, estratti dalle piante inoculate con i diversi ceppi PGPR/ISR, sono stati testati a due diverse concentrazioni (0,1 e 0,01%), per valutarne le proprietà biocida nei confronti dei più importanti batteri e funghi fitopatogeni di specie ortive.

Verso i batteri, alla concentrazione dello 0,1% (tabella 12), tutti gli oli hanno mostrato una spiccata attività biocida, fatta eccezione per alcune specie verso le quali l'inibizione è stata parziale. Non sono state riscontrate differenze significative nell'attività biocida dei diversi oli estratti. Alla concentrazione dello 0,01% (tabella 12), nessuna specie batterica è stata inibita, fatta eccezione per *Xanthomonas axonopodis* pv. *alfa alfa*, la cui inibizione è risultata parziale.

Per i funghi, l'olio estratto dalle piante inoculate con il CEPPO 16 ha mostrato la migliore attività biocida (tabella 12). Infatti, alla concentrazione dello 0,1% ha inibito completamente la crescita di cinque specie fungine (*Fusarium*

*sambucinum*, *Sclerotinia* sp. *Botrytis* sp., *Alternaria* sp. e *Rhizoctonia solani*) e ha parzialmente inibito *Fusarium semitectum* (tabella 12). L'olio estratto dalle piante inoculate con il CEPPO 13, invece, ha inibito la crescita di solo due isolati fungini (*Sclerotinia* sp. e *Verticillium* sp.) così come l'olio estratto dalle piante inoculate con il ceppo 7III BAC, che ha inibito soltanto *R. solani* e *Verticillium* sp. . Alla diluizione dello 0,01% (tabella 12) nessun olio ha inibito la crescita dei funghi fitopatogeni, fatta eccezione per l'olio estratto dalle piante inoculate con il CEPPO 13, che ha inibito parzialmente *Sclerotinia* sp., e per l'olio estratto dalle piante inoculate con il ceppo 7III BAC, che ha inibito parzialmente *Botrytis* sp. (tabella 12).

**Tabella 12.** Attività biocida degli oli essenziali di *Thymus vulgaris* verso batteri e funghi fitopatogeni

Batteri	21V BAC		ANT RHIZ B		7III BAC		CEPPO 13		CEPPO 16		Minerale		ctrl
	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	
<i>X. c. pv. alfa alfa</i>	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+	-	+	-	+/-	-	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>X. c. pv. phaseoli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>X. c. pv. vesicatoria</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>P. carotovorum</i>	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+
<i>P. s. pv. Phaseolicola</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>P. s. pv. syringae</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>P. s. pv. tomato</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

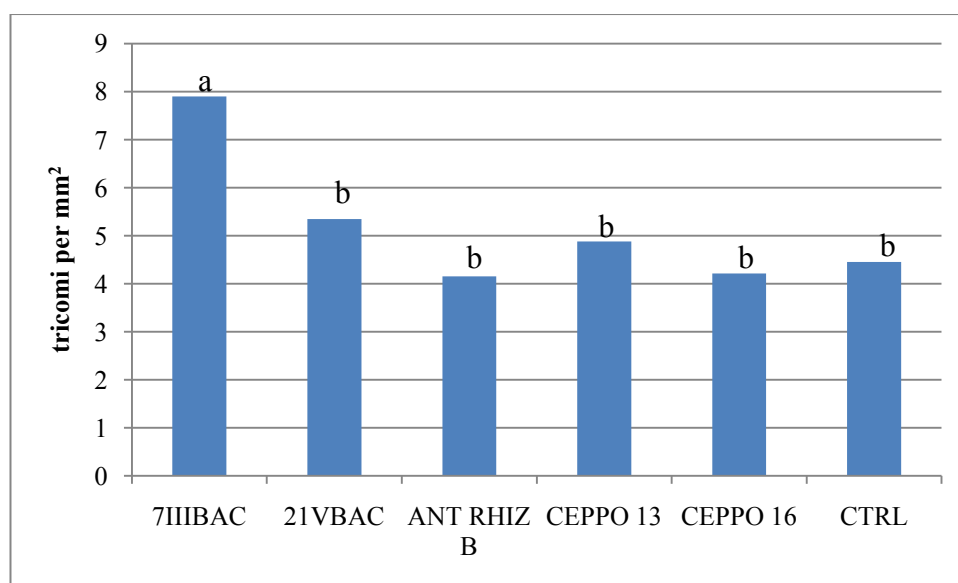
  

Funghi	21V BAC		ANT RHIZ B		7III BAC		CEPPO 13		CEPPO 16		Minerale		ctrl
	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	
<i>F. sambucinum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	-	+	+	+
<i>F. oxysporum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sclerotinia</i> sp.	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-	-	+	-	+	+/-	+
<i>Botrytis</i> sp.	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	-	+	+	+
<i>Alternaria</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>R. solani</i>	+	+/-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>F. solani</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Verticillium</i> sp.	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>F. semitectum</i>	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+/-	+	+	+

+ = crescita, +/- = parziale inibizione, - = inibizione

### 3.2.4 Rilievi biometrici su origano

Dall'analisi dei rilievi biometrici eseguiti sulla prova di inoculazione delle piante di origano con i diversi batteri PGPR/ISR, sono state evidenziate alcune differenze. In particolare, per quanto riguarda il numero di tricomi ghiandolari, le piante di origano inoculate con il ceppo 7III BAC di *Bacillus cereus*, hanno mostrato un numero di tricomi sulle foglie statisticamente superiore rispetto al controllo non trattato (8 e 4,5 tricomi mm<sup>-2</sup> rispettivamente) e rispetto agli altri ceppi inoculati (figura 20).



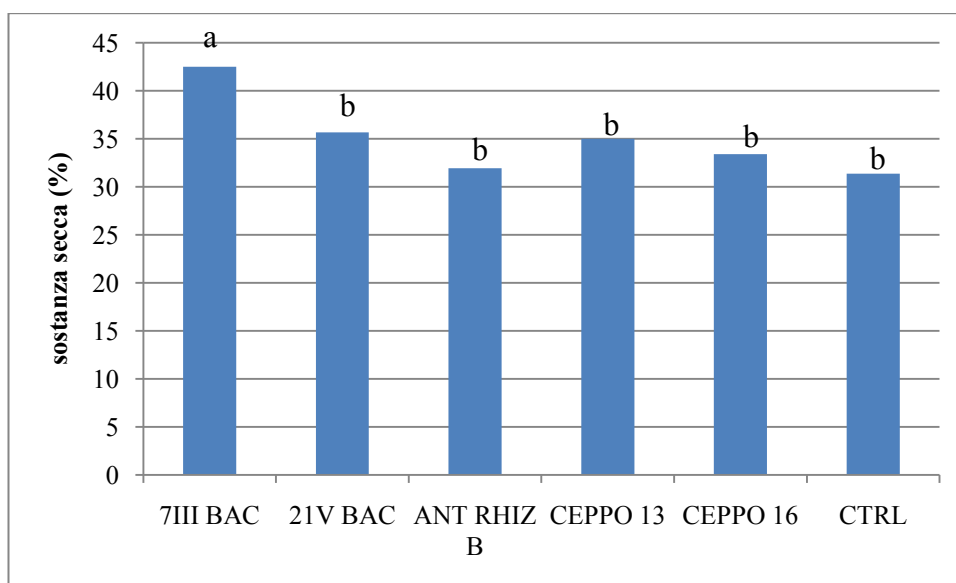
**Figura 20.** Numero di tricomi ghiandolari su piante di *Origanum vulgare* inoculate con diversi ceppi PGPR/ISR.

Differenze sono state osservate anche per la sostanza secca. Infatti, le piante inoculate con il ceppo 7III BAC presentavano valori di sostanza secca superiori (42,5%) non solo rispetto alle piante del controllo non inoculato (31,3%) ma anche rispetto alle piante inoculate con gli altri ceppi (figura 21)

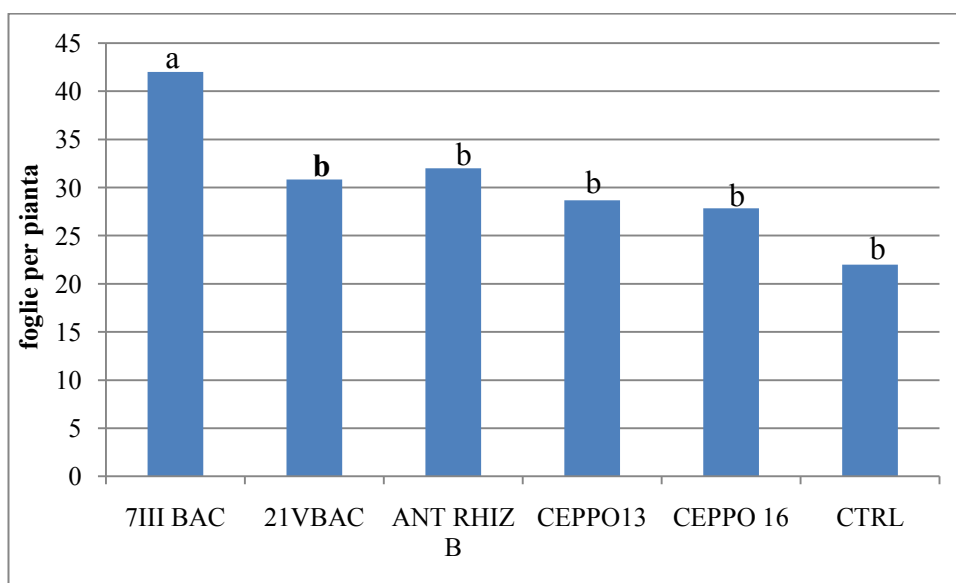
Dalle analisi del numero di foglie si è visto come le piante di origano inoculate con il ceppo 7III BAC di *Bacillus cereus* presentavano il numero più alto (42 foglie per pianta) rispetto agli altri trattamenti di inoculazione e rispetto al controllo (22 foglie per pianta). Come indicato in figura 22, le piante inoculate



con il ceppo 7III BAC hanno prodotto un numero di foglie quasi doppio rispetto al controllo. Sebbene anche gli altri ceppi PGPR/ISR hanno determinato un numero di foglie superiore rispetto al controllo, questi valori non sono risultati statisticamente significativi.

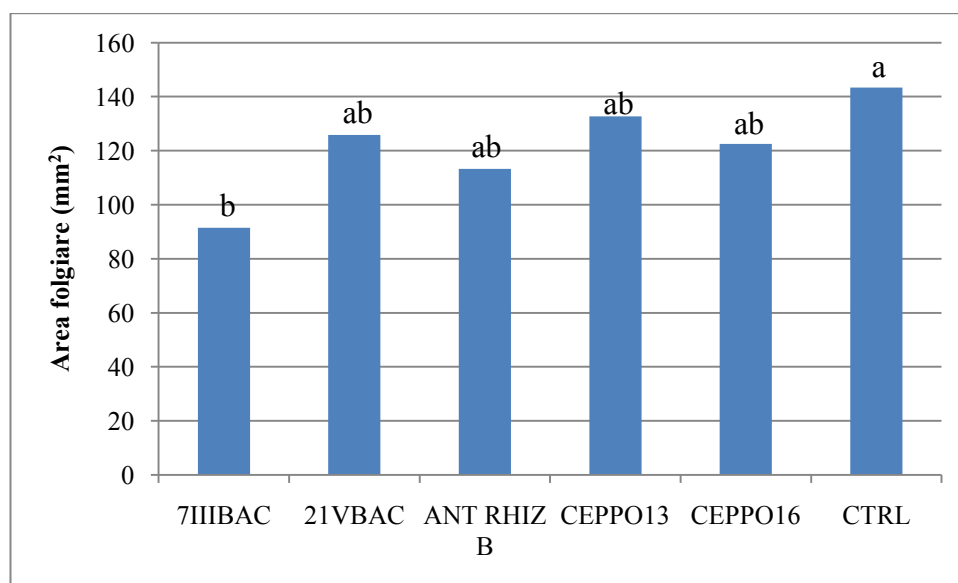


**Figura 21.** Percentuale di sostanza secca in piante di origano inoculate con diversi ceppi PGPR/ISR



**Figura 22.** Numero di foglie in piante di origano inoculate con alcuni batteri PGPR/ISR.

Differenze sono state riscontrate anche per l'area fogliare. Infatti, le piante inoculate con il ceppo 7III BAC di *Bacillus cereus*, hanno mostrato un'area fogliare più ridotta (91,5 mm<sup>2</sup>) rispetto al controllo non inoculato (143,3 mm<sup>2</sup>), come indicato in figura 23.



**Figura 23.** Area fogliare di piante di origano inoculate con diversi batteri PGPR/ISR

### 3.2.5 Resa in olio essenziale di origano

Dall'analisi dei dati ottenuti inerenti l'estrazione degli oli essenziali (tabella 13), sono state riscontrate delle differenze. In particolare, tutte le piante inoculate con il CEPPO 13 di *Pseudomonas fluorescens*, mostravano la resa in olio essenziale più bassa (0,8%) sia rispetto al controllo non inoculato (1,1%) che rispetto agli altri ceppi. La resa maggiore, invece, si è avuta per il ceppo 21VBAC (1,5%).

**Tabella 13.** Resa in olio essenziale di piante di origano inoculate con diversi ceppi PGPR/ISR

Ceppi	Resa in olio essenziale
	(%)
7III BAC	1,2
21V BAC	1,5
ANT RHIZ B	1,3
CEPPO 13	0,8
CEPPO 16	1,4
CTRL	1,1

### 3.2.6 Test di attività biocida dell'olio di origano

Gli oli essenziali estratti dalle piante di origano inoculate con i diversi ceppi PGPR/ISR sono stati testati a due diverse concentrazioni (0,1 e 0,01%), per valutare le loro proprietà biocide nei confronti dei principali batteri e funghi fitopatogeni. Verso i batteri, alla concentrazione dello 0,1%, tutti gli oli hanno mostrato una spiccata attività biocida, fatta eccezione per *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (tabella 14). Verso il primo batterio, infatti, si è avuta una parziale inibizione da parte di tutti gli oli testati ad eccezione dell'olio estratto dalle piante inoculate con il ceppo 21V BAC di *Rhodococcus erythropolis*, verso il quale non vi è stata inibizione. Verso il secondo batterio, invece, si è osservata una parziale inibizione da parte degli oli estratti dalle piante inoculate con i ceppi ANT RHIZ B di *Bacillus subtilis* e CEPPO 13 di *Pseudomonas fluorescens* (tabella 14).

Alla concentrazione dello 0,01%, l'olio che ha inibito la crescita del maggior numero di specie batteriche è stato quello estratto dalle piante inoculate con il CEPPO 16 e con il ceppo 7III BAC (tabella 14).

Verso i funghi fitopatogeni, alla concentrazione dello 0,1%, la migliore attività biocida si è avuta con l'olio estratto dalle piante inoculate con il ceppo 7III BAC. Infatti, quest'olio è stato in grado di inibire la crescita di tutti i funghi, fatta eccezione per *Fusarium oxysporum* e *F. solani*. Queste due specie di *Fusarium* non sono state inibite da nessuno degli oli di origano testati in questa prova. Alla diluizione dello 0,01% nessun olio ha inibito la crescita dei funghi fitopatogeni, fatta eccezione per l'olio estratto dalle piante inoculate con il CEPPO 13, che ha mostrato una parziale inibizione verso *Sclerotinia* sp. (tabella 14).

**Tabella 14.** Antibiosi degli oli essenziali estratti da piante di *Origanum vulgare* inoculate con diversi ceppi PGPR/ISR verso batteri e funghi fitopatogeni.

Batteri	21V BAC		ANT RHIZ B		7III BAC		CEPPO 13		CEPPO 16		Minerale		ctrl
	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	
<i>X. pv. alfa alfa</i>	-	-	+/-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>X. c. pv. campestris</i>	+	+	+	+/-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
<i>X. c. pv. phaseoli</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>X. c. pv. vesicatoria</i>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>P. carotovorum</i>	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+
<i>P. s. pv. phaseolicola</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>P. s. pv. syringae</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>P. s. pv. tomato</i>	+	-	+	-	+/-	-	+	-	+/-	-	+	-	+

Funghi	21V BAC		ANT RHIZ B		7III BAC		CEPPO 13		CEPPO 16		Minerale		ctrl
	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	0,01%	0,1%	
<i>F. sambucinum</i>	+	+	+	+	+	-	+	+/-	+	+	+	+	+
<i>F. oxysporum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sclerotinia</i> sp.	+	-	+	-	+	-	+/-	-	+	+/-	+	-	+
<i>Botrytis</i> sp.	+	-	+	-	+	-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+
<i>Alternaria</i> sp..	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. solani</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>F. solani</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Verticillium</i> sp.	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
<i>F. semitectum</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+/-	+	+	+

+ = crescita, +/- = parziale inibizione, - = inibizione

### 3.3 Attività auxino-simile di CEPPO 16 e 7III BAC

Dai risultati ottenuti con i test di biosaggio dell'attività auxino-simile dei filtrati colturali del CEPPO 16 di *Pseudomonas putida* e del ceppo 7III BAC di *Bacillus cereus*, è stato osservato come alla diluizione del 10% entrambi i batteri abbiano incrementato sia il numero delle radici degli ipocotili di fagiolo (48,4 con il CEPPO 16 e 58,3 con il 7III BAC), sia la percentuale di sostanza secca delle radici (14,4 % per il CEPPO 16 e 9,4 % per il 7III BAC), rispetto al controllo trattato con acqua (numero radici 20,2 e sostanza secca radici 5,6%). Tale incremento è stato riscontrato anche alla diluizione dell'1 %, sebbene in misura più ridotta.

**Tabella 22.** Attività auxino-simile dei filtrati colturali dei ceppi 7III BAC e CEPPO 16

Filtrati colturali	n°radici	sostanza secca (%)
Acqua	20,2	5,6
IBA $1 \times 10^{-7}$	72,3	16,4
CEPPO 16 10 %	48,4	14,4
CEPPO 16 1 %	21,0	11,1
7III BAC 10 %	58,3	9,4
7III BAC 1 %	28,4	8,2

### 3.4 Prova ammendanti in pieno campo

#### 3.4.1 Rilievi biometrici su timo

Dall'analisi dei rilievi biometrici eseguiti sulle piante di timo trattate in pieno campo con diversi ammendanti, sono state osservate alcune differenze. In particolare, per quanto riguarda la biomassa prodotta, le piante ammendate con compost hanno fornito una resa più bassa ( $6,5 \text{ t ha}^{-1}$ ) rispetto a quelle di controllo ( $7,2 \text{ t ha}^{-1}$ ) e a quelle delle altre tesi. Non sono state riscontrate differenze significative per quanto riguarda i rilievi eseguiti sulla sostanza secca. Differenze, invece, sono emerse dall'analisi della fioritura delle piante. Infatti, le tesi ammendate con compost hanno mostrato, al momento della raccolta, un

maggior numero di piante non fiorite (76,7) rispetto a quanto registrato per tutte le altre tesi (tabella 15).

**Tabella 15.** Principali rilievi biometrici eseguiti alla raccolta sulle piante di *Thymus vulgaris* L.

Trattamento	Fioritura			Sost. Secca (%)	Biomassa (t/ha)
	Fiorite	In fioritura	Non fiorite		
<b>Minerale 0</b>	13,3 b	20,0 b	66,7 b	38,0 a	7,2 a
<b>Minerale 70</b>	6,7 b	40,0 a	53,3 b	35,3 a	8,4 a
<b><i>B. carinata</i></b>	20,0 b	30,0 ab	50,0 b	35,6 a	8,8 a
<b>Girasole</b>	33,3 a	6,7 b	60,0 b	35,1 a	8,8 a
<b>Compost</b>	10,0 b	13,3 b	76,7 a	36,3 a	6,5 b

p<0,05

### 3.4.2 Resa in olio essenziale di timo

La resa di estrazione degli oli essenziali (tabella 16) è stata differente tra le diverse tesi. In particolare, la resa in olio ottenuta dalle tesi trattate con farina di girasole e concimate con 70 U ha<sup>-1</sup> di azoto minerale, (pari rispettivamente a 24 l ha<sup>-1</sup> e 20 l ha<sup>-1</sup>) sono risultate significativamente superiori rispetto alle rese ottenute dalle tesi non concimate (11 l ha<sup>-1</sup>), ammendata con *B. carinata* (14 l ha<sup>-1</sup>) e ammendata con compost (15 l ha<sup>-1</sup>).

**Tabella 16.** Resa in olio essenziale di piante di timo allevate in pieno campo in terreni differentemente ammendati

Trattamento	Resa olio essenziale l/ha
minerale 0	11 <b>b</b>
minerale 70	20 <b>a</b>
Farina di <i>B. carinata</i>	14 <b>b</b>
farina di girasole	24 <b>a</b>
compost	15 <b>b</b>

P<0,05

### **3.4.3 Determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) dell' olio di timo**

Gli oli estratti dalle piante di timo sono stati testati a diverse concentrazioni al fine di determinare la concentrazione minima inibente (MIC) verso i principali batteri e funghi fitopatogeni. Verso i batteri (tabella 17) i diversi oli hanno mostrato un'attività antimicrobica abbastanza simile. In particolare, le specie batteriche più sensibili sono state *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *alfa alfa* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, mentre, le specie meno sensibili sono risultate *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Verso i funghi fitopatogeni (tabella 17), invece, è stata riscontrata una maggiore attività biocida con l'olio estratto dalle piante ammendate con farina di semi di girasole. Questo, infatti, ha mostrato la MIC più bassa per tutti i funghi testati, rispetto agli altri oli. Gli oli estratti dalla tesi non ammendata e dalla tesi ammendata con compost hanno mostrato i valori di MIC più alti (tabella 17).



**Tabella 17.** MIC verso batteri e funghi fitopatogeni degli oli essenziali di piante di *Thymus vulgaris* differentemente ammedate

<b>Bacteria</b>	<b>Minerale 0 (%)</b>	<b>mineral 70 (%)</b>	<b><i>B. carinata</i> (%)</b>	<b>Girasole (%)</b>	<b>Compost (%)</b>
<i>X. c. pv. campestris</i>	>0,005	>0,01	>0,005	>0,01	>0,005
<i>P. carotovorum</i>	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01
<i>P. s. pv. phaseolicola</i>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
<i>P. s. pv. syringae</i>	>0,01	>0,01	>0,05	>0,05	>0,01
<i>P. s. pv. tomato</i>	>0,01	>0,05	>0,05	>0,005	>0,01
<i>X. c. pv. vesicatoria</i>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
<i>X. a. pv. alfa alfa</i>	>0,01	>0,01	>0,01	>0,05	>0,01
<i>X. c. pv phaseoli</i>	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005

<b>Funghi</b>	<b>Minerale 0 (%)</b>	<b>mineral 70 (%)</b>	<b><i>B. carinata</i> (%)</b>	<b>Girasole (%)</b>	<b>Compost (%)</b>
<i>F. oxysporum</i>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
<i>Alternaria sp.</i>	>0,1	>0,05	>0,07	>0,01	>0,1
<i>F. sambucinum</i>	>0,1	>0,07	>0,07	>0,1	>0,1
<i>F. semitectum</i>	>0,1	>0,07	>0,07	>0,01	>0,1
<i>Verticillium sp.</i>	>0,1	>0,05	>0,05	>0,01	>0,05
<i>R. solani</i>	>0,07	>0,05	>0,05	>0,01	>0,05
<i>F. solani</i>	>0,1	>0,1	>0,1	>0,05	>0,1
<i>Sclerotinia sp.</i>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,01	>0,05

#### 3.4.4 Composizione chimica dell'olio di timo

L'analisi chimica degli oli essenziali ha permesso l'identificazione di 14 composti monoterpenici (tabella 18). Differenze sono state osservate tra gli oli estratti dalle piante delle diverse tesi. In generale, per tutti gli oli, il composto che ha mostrato la resa più alta è stato il timolo. In particolare, la tesi di controllo e le tesi ammendate con *B. carinata* e girasole hanno fornito una resa rispettivamente dell' 89,3 %, 85,7 % e 83,0 %. Anche i composti carvacrolo, *p*-cimene,  $\gamma$ -terpinene e linalolo hanno mostrato una resa più alta rispetto agli altri composti identificati. Nello specifico, l'olio estratto dalla tesi "minerale 70" ha determinato le rese di *p*-cimene (7,5 %) e di  $\gamma$ -terpinene (5,0) più alte rispetto agli altri oli. Al contrario, le rese più basse di questi due componenti (*p*-cimene 2,0 % e  $\gamma$ -terpinene 1,4 %) sono state riscontrate nell'olio estratto dalle piante della tesi non concimata, così come sono risultate più basse le rese di tutti gli altri composti identificati, fatta eccezione per il timolo e il carvacrolo. È stato notato, inoltre, che l'olio estratto dalla tesi non concimata mancava di alcuni composti (1-octen-3-ol, 1-8 cineolo, canfora) presenti, invece, negli altri oli.

**Tabella 18.** Composizione degli oli essenziali di timo differentemente ammendati

<b>Composto</b>	<b>KI</b>	<b>Minerale 0</b>	<b>Minerale 70</b>	<b><i>B. carinata</i></b>	<b>Girasole</b>	<b>Compost</b>	<b>Metodo di identificazione</b>
1-octen-3-ol	978	--	0,4	0,4	0,4	0,4	NIST
$\alpha$ -terpinene	1013	--	--	0,1	--	--	NIST
$p$ -cimene	1025	2,0	7,5	2,3	4,6	4,5	NIST, ST
1-8 cineolo	1034	--	0,3	0,2	0,2	0,5	NIST
$\gamma$ -terpinene	1057	1,4	5,0	1,6	2,7	4,9	NIST, ST
terpinolene	1088	--	0,5	0,6	0,5	0,8	NIST
linalolo	1098	1,1	1,5	1,8	1,8	1,9	NIST
camfora	1145	--	--	0,1	0,2	0,2	NIST
borneolo	1167	0,9	0,8	0,9	1,1	1,1	NIST, ST
4-terpineolo	1177	0,4	0,7	0,7	0,6	0,9	NIST
$\alpha$ -terpineolo	1189	--	0,1	--	--	0,2	NIST
timol-metil-etere	1235	0,5	0,5	0,9	0,5	1,1	NIST
timolo	1293	89,3	78,6	85,7	83,0	77,9	NIST, ST
carvacrolo	1299	4,3	4,1	4,6	4,4	4,6	NIST, ST

KI= Kovat index, ST= standard

### 3.5 Prova PGPR/ISR in pieno campo

#### 3.5.1 Rilievi biometrici su timo

I rilievi eseguiti sulla prova di inoculazione delle piante di timo con i diversi batteri PGPR/ISR, non hanno evidenziato particolari differenze. L'impiego del "CEPPO 16" di *Pseudomonas putida* ha però incrementato la resa in biomassa delle piante, sebbene in misura statisticamente non significativa (tabella 19). Inoltre, alla dose di 35 U ha<sup>-1</sup>, è stato constatato un incremento della resa in biomassa rispetto al controllo non concimato. Anche in questo caso, tali risultati non sono stati statisticamente significativi.

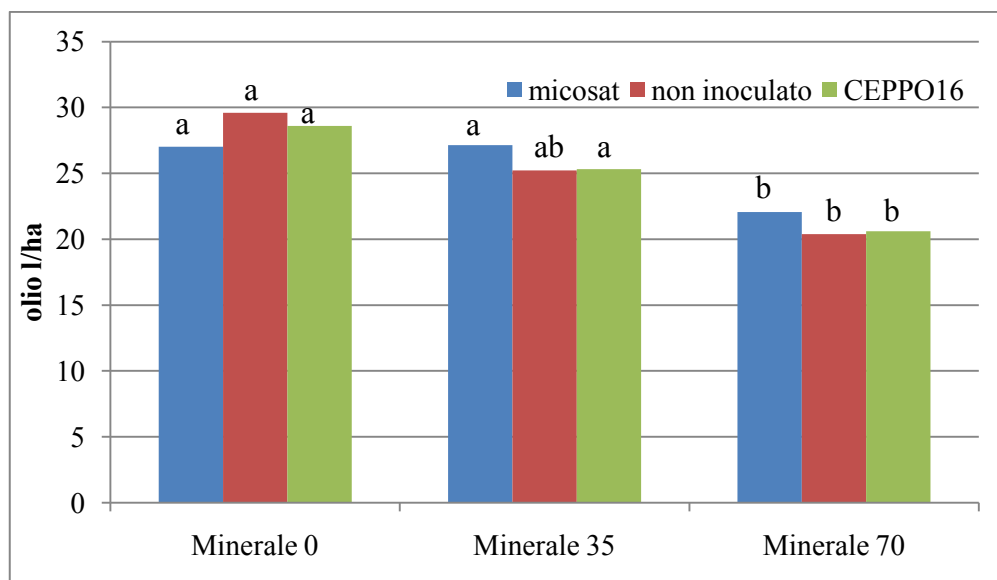
**Tabella 19.** Resa in biomassa di timo allevato su tre tesi con differenti dosi di azoto e inoculate con ceppi PGPR/ISR.

<b>inoculo</b> <b>concimazione</b>	Micosat	non inoculato	CEPPO 16	<i>media concimazione</i>
Minerale 0	8,6 <b>a</b>	8,7 <b>a</b>	8,5 <b>a</b>	8,6
Minerale 35	8,3 <b>a</b>	9,6 <b>a</b>	10,1 <b>a</b>	9,3
Minerale 70	8,5 <b>a</b>	8,1 <b>a</b>	9,0 <b>a</b>	8,5
<i>media inoculo</i>	8,5	8,8	9,2	

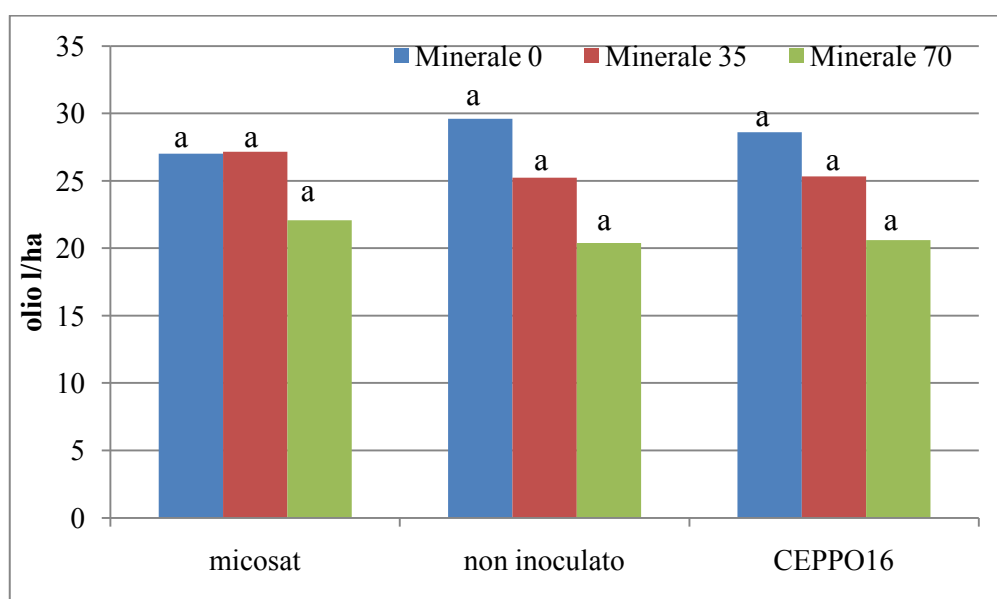
p<0,05

#### 3.5.2 Resa in olio essenziale di timo

Dall'analisi dei dati ottenuti sull'estrazione degli oli essenziali (figura 24), non sono state osservate particolari differenze ascrivibili all'impiego del CEPPO 16 o del preparato commerciale Micosat. Infatti, alle differenti dosi di azoto, i due promotori di crescita non si sono distinti dal rispettivo controllo non inoculato, per quanto riguarda la resa in olio essenziale. Differenze sono state riscontrate, invece, con le differenti dosi di azoto. Infatti, la resa più bassa in olio è stata ottenuta da piante provenienti dalla tesi "minerale 70"; al contrario, le rese più elevate sono state ottenute dalle piante provenienti dalla tesi non concimata (figura 25).



**Figura 24.** Effetto dell'impiego di PGPR/ISR sulla resa in olio in piante di timo allevate con apporti crescenti di azoto



**Figura 25.** Effetto di diverse concentrazioni di azoto sulla resa dell'olio in piante di timo inoculate con PGPR/ISR

### 3.5.3 Determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) dell'olio di timo

Gli oli estratti dalle piante di timo sono stati testati a diverse concentrazioni per determinare la concentrazione minima inibente (MIC) verso i principali batteri e funghi fitopatogeni. Verso i batteri (tabella 20) i diversi oli hanno mostrato un'attività antimicrobica simile. In particolare, le specie batteriche più sensibili sono risultate *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *alfa alfa* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, verso le quali gli oli hanno mostrato una MIC di 0,005%. Viceversa, le specie batteriche meno sensibili sono state *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (MIC < 0,01) e *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (0,01 > MIC > 0,005).

Per i funghi fitopatogeni (tabella 20), si è visto come le specie più sensibili siano state *Verticillium* sp. e *Rhizoctonia solani* (MIC > 0,005), mentre le specie fungine meno sensibili sono risultate *Fusarium semitectum* e *Fusarium solani* (MIC > 0,01). Con l'olio estratto dalle piante raccolte dalla tesi non concimata e inoculata con il CEPPO 16, sono stati registrati valori di MIC più bassi verso *Fusarium oxysporum*, *Alternaria* sp. e *Fusarium sambucinum* (MIC > 0,005) rispetto al controllo non inoculato (MIC > 0,01).

### 3.5.4 Composizione chimica dell'olio di timo

Con l'analisi chimica degli oli essenziali sono stati identificati 14 composti monoterpenici (tabella 21). Differenze sono state osservate tra gli oli estratti dalle piante raccolte dalle diverse tesi. In generale, per tutti gli oli, il composto che ha mostrato la resa più alta è stato il timolo. In particolare, la tesi "minerale 35" inoculata con il CEPPO 16 di *Pseudomonas putida* ha mostrato una resa dell'81,2%, superiore rispetto agli oli ottenuti dagli altri trattamenti.

Anche il carvacrolo, il *p*-cimene, il  $\gamma$ -terpinene e il linalolo hanno mostrato una resa più elevata rispetto agli altri composti identificati. Nello specifico, gli oli estratti dalle tesi "minerale 70" e "minerale 0" inoculate con il CEPPO 16, hanno dato le rese di *p*-cimene (rispettivamente 10,8 % e 9,1 %) e di  $\gamma$ -terpinene (rispettivamente 5,1 % e 5,5 %) più alte rispetto agli altri oli. Per contro, le stesse tesi hanno fornito le rese più basse di timolo (73,6 % nel "minerale 70-CEPPO 16" e 75,1 % nel "minerale 0-CEPPO 16") (tabella 21).

**Tabella 20.** MIC verso batteri e funghi fitopatogeni, degli oli essenziali di piante di *Thymus vulgaris* allevate con diverse dosi di azoto e inoculate con PGPR/ISR

Batteri	Minerale 0			Minerale 35			Minerale 70		
	CEPPO 16	non inoculato	micosat	CEPPO 16	non inoculato	micosat	CEPPO 16	non inoculato	micosat
<i>X. a. pv alfa alfa</i>	>0,005	>0,005	>0,005	>0,01	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005
<i>X. c. pv. campestris</i>	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005
<i>X. c. pv phaseoli</i>	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005
<i>X. vesicatoria</i>	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01
<i>P. carotovorum</i>	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005
<i>P. s. pv. phaseolicola</i>	>0,01	>0,005	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,01	>0,01	>0,05
<i>P. s. pv. syringae</i>	>0,01	>0,005	>0,005	>0,01	>0,005	>0,005	>0,01	>0,005	>0,01
<i>P. s. pv. tomato</i>	>0,005	>0,005	>0,005	>0,01	>0,005	>0,005	>0,005	>0,01	>0,005

Funghi	Minerale 0			Minerale 35			Minerale 70		
	CEPPO 16	non inoculato	micosat	CEPPO 16	non inoculato	micosat	CEPPO 16	non inoculato	micosat
<i>F. sambucinum</i>	>0,005	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01
<i>F. oxysporum</i>	>0,005	>0,01	>0,005	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,005
<i>F. solani</i>	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01
<i>F. semitectum</i>	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01
<i>Sclerotinia</i> sp.	>0,01	>0,01	>0,005	>0,005	>0,01	>0,01	>0,005	>0,005	>0,005
<i>Alternaria</i> sp.	>0,005	>0,01	>0,01	>0,005	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01	>0,01
<i>Verticillium</i> sp.	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005	>0,005
<i>R. solani</i>	>0,005	>0,005	>0,01	>0,005	>0,005	>0,005	>0,01	>0,005	>0,005

**Tabella 21.** Composizione chimica degli oli essenziali di piante di timo allevate con diverse dosi di azoto e inoculate con PGPR/ISR

composti	KI	Minerale 0			Mineral 35			Minerale 70		
		non inoculato	CEPPO16	Micosat	non inoculato	CEPPO16	Micosat	non inoculato	CEPPO16	Micosat
1-octen-3-ol	978	0,6	0,5	0,7	0,6	0,3	0,2	0,3	0,4	0,4
$\alpha$ -terpinene	1013	--	0,3	--	0,2	--	--	--	0,2	0,2
$p$ -cimene	1025	7,6	9,1	7,8	6,8	7,4	7,9	8,1	10,8	7,7
1-8 cineolo	1034	0,5	0,5	--	0,7	0,2	0,2	0,4	0,5	0,4
$\gamma$ -terpinene	1057	3,8	5,5	4,2	3,5	3,2	4,4	4,3	5,1	4,2
terpinolene	1088	0,7	0,6	0,5	0,8	0,6	0,6	0,8	0,7	0,1
linalolo	1098	1,8	1,8	2,1	1,6	1,2	1,2	1,0	1,3	1,5
camfora	1145	0,5	0,2	--	0,3	0,1	--	0,3	0,2	0,1
borneolo	1167	0,9	1,1	0,9	1,0	0,9	1,0	0,8	1,3	0,9
4-terpineolo	1177	0,8	0,7	--	0,8	0,5	0,4	0,4	0,5	0,7
$\alpha$ -terpineolo	1189	--	0,1	--	0,2	--	--	--	0,1	0,1
timol-metil-etere	1235	0,7	0,4	0,6	1,1	--	1,0	--	0,8	1,0
timolo	1293	77,6	75,1	77,7	75,4	81,2	78,7	79,6	73,6	75,6
carvacrolo	1299	4,1	4,0	4,3	5,8	4,2	3,9	4,0	4,0	5,7

KI= Kovat index, ST= standard



## **Capitolo 4      Discussioni**

I composti volatili delle piante, specialmente gli oli essenziali, hanno una spiccata attività antimicrobica verso molti patogeni dell'uomo, degli animali, delle piante e degli alimenti. La coltura fuori suolo di specie officinali, in particolare l'idroponica, può fornire molti vantaggi, quali la standardizzazione del processo di produzione, un maggiore accumulo di principi attivi e una migliore qualità della materia prima (Giorgi e Licheri, 2007, Pacifici *et al.*, 2007, Pace *et al.*, 2007).

Di fatto, l'interesse per questo sistema di coltivazione è crescente (Dorais *et al.*, 2001; Gontier *et al.*, 2002; Zobayed e Saxena, 2004) e attualmente è particolarmente impiegato per colture orticole in serra e per la produzione di piantine in vivaio. Se la coltura delle piante officinali è realizzata all'interno di serre termoregolate o in camere di crescita, l'idroponica può dare origine ad un vero e proprio sistema di coltura artificiale in grado di offrire diversi vantaggi, quali la regolazione della sintesi e dell'accumulo di principi attivi d'interesse, soprattutto attraverso modificazioni delle condizioni climatiche e nutrizionali. L'impiego dei differenti ammendanti, in ambiente controllato, sulle due specie officinali oggetto di studio, si è inserito proprio nell'ottica di sfruttare le proprietà nutrizionali e stimolanti di tali prodotti, al fine di regolare la resa qualitativa degli oli essenziali.

Dai risultati ottenuti si può affermare che i diversi ammendanti influiscono positivamente non solo sui caratteri biometrici delle due labiate, ma anche e soprattutto sulla resa degli oli essenziali estratti. Sebbene non siano presenti in letteratura sperimentazioni simili a quelle qui condotte, le rese in olio sono risultate superiori rispetto a quelle indicate dalla farmacopea ufficiale e a quelle registrate in altre sperimentazioni dove è stato impiegato soltanto concime minerale (Martinetti *et al.*, 2006). In particolare, le rese più elevate sono state ottenute con l'impiego della farina di semi di *Brassica carinata*, sia per il timo che per l'origano. La spiegazione di come questo ammendante abbia influito in maniera così forte sulla resa in olio, potrebbe essere duplice. In *B. carinata* come nelle *Brassicaceae* e in altre famiglie botaniche minori, è presente il sistema

chimico glucosinolati-mirosinasi. I glucosinolati sono composti che, in presenza di acqua e dell'enzima mirosinasi, idrolizzano dando origine a tiocianati, isotiocianati e nitrili. Queste sostanze, sebbene siano prodotte dalle piante per contrastare l'attacco di insetti fitofagi (Lazzeri *et al.*, 2007) presentano anche un effetto fitotossico. Tale effetto si esplica soprattutto nei primissimi giorni dall'incorporazione delle farine nel suolo. Pertanto è possibile ipotizzare che, al momento del trapianto, fosse presente ancora una fitotossicità residua da parte delle farine di *B. carinata* mescolate nel substrato. Tale tossicità potrebbe, quindi, aver stimolato il metabolismo secondario delle piante nei primi stadi di sviluppo, con conseguente maggiore accumulo degli oli essenziali. A tale effetto, si è sicuramente associato quello ammendante e fertilizzante, che ha consentito alle piante un incremento della crescita, grazie alla maggiore disponibilità di elementi nutritivi, quali microelementi, fosforo, potassio e azoto.

In pieno campo, invece, la situazione è stata alquanto diversa. Le migliori rese sono state ottenute con la concimazione minerale e con la farina di girasole, mentre quelle più basse sono state ottenute con la tesi non concimata. Tali risultati potrebbero rappresentare un chiaro esempio dell'influenza della concimazione azotata sulla resa in termini di olio estratto dalle piante officinali.

È noto che la crescita e la sopravvivenza di molte specie di piante e, in particolar modo, delle specie officinali, è gravemente compromessa in suoli pesanti (quale quello dell'Azienda di Battipaglia del CRA-ORT, presso cui sono state condotte le prove) (Hornok *et al.*, 1988) con conseguente notevole riduzione delle rese delle colture, dell'olio essenziale e dei principali composti volatili. In accordo con i risultati di alcuni lavori (Figueiredo *et al.*, 2008), la fertilizzazione delle piante officinali con azoto ha generalmente mostrato un incremento della resa dell'olio anche se, secondo altre ricerche (Figueiredo *et al.*, 1997), tale incremento non influisce sulla composizione chimica dell'olio stesso. Al contrario, in un lavoro condotto in ambiente controllato su piante di *Achillea millefolium*, concimate con bassi livelli di azoto è stata osservata, a fronte di un decremento della resa in olio, un incremento delle concentrazioni delle principali componenti terpeniche (Giorgi e Licheri, 2007), accompagnato da un incremento dell'attività antimicrobica.

Dall'analisi biochimica dell'olio di timo prodotto nelle nostre prove di campo risulta, quindi, chiara la correlazione tra il tipo di concimazione, la resa dell'olio e la composizione di quest'ultimo. Infatti, la tesi non concimata ha prodotto la minore resa in olio, ma ha mostrato una concentrazione maggiore del principale componente terpenico bioattivo: il timolo. Anche con l'impiego del compost, si è evidenziata una correlazione negativa tra la resa in olio e la concentrazione di timolo. E' possibile che questo comportamento sia imputabile ad una minore disponibilità di azoto nel terreno concimato con compost rispetto alla concimazione azotata minerale. Molto interessante, invece, è stato il comportamento della farina di semi di girasole, che oltre ad aver determinato una resa in olio maggiore, ha determinato anche un'elevata concentrazione in timolo mostrando, altresì, la migliore attività antimicrobica. Il motivo per cui con tale ammendante si è avuta una resa maggiore in olio è probabilmente da ricercarsi nella maggiore disponibilità di azoto e di altri elementi da parte della farina di disoleazione rispetto al compost, visto che nella prima l'azoto mineralizza più velocemente (Zaccardelli *et al.*, 2008). Inoltre, non è da escludere il già menzionato possibile effetto fitotossico residuo rilasciato dalle farine di *B. carinata*.

In merito alle sperimentazioni condotte in ambiente controllato con i batteri PGPR/ISR, due dei ceppi inoculati hanno mostrato una buona azione promotrice della crescita: un ceppo di *Pseudomonas putida*, per il timo e un ceppo di *Bacillus cereus*, per l'origano. L'incremento dello sviluppo delle piante a seguito dell'inoculazione con i PGPR è stato ampiamente riportato per molte specie (Van Loon *et al.*, 2007; Vessey 2003). In accordo con i nostri risultati, è stato riportato che ceppi di *P. putida* migliorano la crescita delle piante mediante la produzione di sostanze ormonali quali l'acido indolacetico (IAA) e le citochinine (Meyer e Lindermann 1986). Pochi sono stati i tentativi di chiarire l'effettivo contributo da parte di PGPR sulla resa quali-quantitativa dei metaboliti secondari delle piante officinali (El Ghandour *et al.*, 2009). I risultati delle sperimentazioni qui condotte evidenziano come l'inoculo con *P. putida* e con *B. cereus* abbia incrementato la resa in olio essenziale, rispettivamente in timo e origano. Anche l'attività

antimicrobica è risultata migliore, soprattutto nei confronti dei funghi fitopatogeni. Sebbene nelle prove in ambiente controllato non sia stata determinata la composizione chimica degli oli, è presumibile che il miglioramento dell'attività antimicrobica sia dovuto ad un incremento della biosintesi dei terpeni. L'induzione della sintesi dei monoterpeni in *Origanum vulgare* L. e in *Thymus vulgaris* L. è in accordo con studi precedentemente condotti su altre specie aromatiche (Banchio *et al.*, 2010, Banchio *et al.*, 2008). L'induzione dei metaboliti secondari è stata riportata anche in interazioni pianta-micorrize su *Mentha arvensis* mostrando, inoltre, un incremento dei principali caratteri biometrici e della resa in olio (Gupta *et al.*, 2002). In piante di *Origanum* sp. è stato osservato un cambiamento della concentrazione dell'olio (ma non della composizione chimica) quando inoculate con micorrize (Khaossad *et al.*, 2006). Dall'analisi dei rilievi biomorfologici, sia sulle piante di timo che su quelle di origano, si è constatato che il ceppo di *P. Putida* e il ceppo di *B. cereus* hanno incrementato il numero di tricomi ghiandolari (strutture adibite allo stoccaggio degli oli essenziali) sulla superficie fogliare. Questo risultato è in linea con quanto descritto da Copetta *et al.*, (2006) su piante di *Ocimum basilicum* inoculate con micorrize. Le possibili spiegazioni di tale aumento sono da ricercarsi nelle diverse attività di promozione della crescita dei ceppi PGPR: produzione di ormoni, solubilizzazione del fosforo, disponibilità di azoto, produzione di sostanze antibiotiche e di enzimi litici, maggiore permeabilità delle radici. Inoltre, i PGPR sono spesso in grado di stimolare la produzione di metaboliti secondari delle piante mediante meccanismi di induzione di resistenza (ISR) (Klopper *et al.*, 1993). Gli agenti biologici, pur non essendo batteri patogeni, possono agire come efficaci elicitori di enzimi chiave coinvolti nel metabolismo secondario correlato, quest'ultimo, con la difesa delle piante da agenti patogeni (Arshad e Frankerberger, 1993).

La prova in campo condotta su timo inoculato con il ceppo di *P. putida* ha mostrato rese diverse a seconda della concimazione azotata. Nello specifico, gli oli estratti dalle tesi "minerale 70" e "minerale 0" inoculate con il CEPPO 16, presentavano le rese di *p*-cimene e di *γ*-terpinene più alte rispetto agli altri trattamenti. Per contro, le suddette tesi hanno fornito le rese più basse di timolo.

Malgrado siano state riscontrate differenze nella composizione dell'olio, l'attività battericida e fungicida è risultata simile per tutti gli oli.

A supporto di questi risultati, si è visto da alcuni studi che l'olio essenziale nel suo complesso mostra un'attività antimicrobica maggiore rispetto alla miscela dei suoi principali componenti (Gill *et al.*, 2002, Mourey e Canillac, 2002). Ciò suggerisce, quindi, che i componenti minori possono essere critici per l'attività dell'olio essenziale a seguito di un effetto sinergico tra i componenti. Da un lavoro svolto su *B. cereus* è stato notato che il *p*-cimene, di per sé un blando antibatterico, ha la capacità di far rigonfiare le membrane delle cellule batteriche in misura maggiore rispetto al timolo, permettendo il trasporto facilitato di quest'ultimo all'interno delle cellule stesse, dove esplica la sua azione biocida. In tale modo si ottiene un effetto sinergico quando i due componenti vengono impiegati congiuntamente (Ultee *et al.*, 2000).

Per quel che concerne le proprietà antimicrobiche degli oli essenziali e dei loro componenti, queste sono conosciute già da molto tempo (Burt, 2004) ma i meccanismi d'azione dei vari composti non sono ancora stati studiati nel dettaglio (Lambert *et al.*, 2001). Dato l'elevato numero di composti chimici presenti negli oli essenziali, è presumibile che la loro attività antimicrobica non sia attribuibile ad uno specifico meccanismo ma piuttosto a diversi (Carson *et al.*, 2002). Nel caso degli oli di timo estratti da tesi differentemente ammendate, la variabilità della composizione è attribuibile per lo più alla concentrazione dei singoli composti piuttosto che alla presenza o assenza di questi. Inoltre, la maggior parte dei composti è risultata appartenere alla famiglia dei monoterpeni ossigenati e, pertanto, con meccanismo di azione più o meno simile. Un'importante caratteristica degli oli essenziali e dei loro componenti è la lipofilia, che permette di penetrare nella membrana cellulare incrementandone la permeabilità. Questo provoca la fuoriuscita di ioni e di molecole dalla cellula fino a causarne la morte (Burt e Reinders, 2003). Infatti, dai nostri risultati si evince come, sia con l'olio di timo che di origano, la maggiore azione antimicrobica venga esplicita nei confronti delle specie batteriche, sulle quali sono risultate attive concentrazioni molto basse degli oli testati. Generalmente gli oli essenziali che possiedono maggiori proprietà antimicrobiche contengono un'elevata percentuale di componenti fenoliche, quali carvacrolo e timolo (Juliano *et al.*, 2000; Lambert *et*

*al.*, 2001). Il loro meccanismo sembra essere simile a quello di altri fenoli che in genere agiscono sulla membrana plasmatica delle cellule (Burt, 2004). La struttura chimica dei singoli componenti degli oli essenziali determina la modalità d'azione antimicrobica (Dorman e Deans, 2000). È stata ad esempio confermata l'importanza della presenza del gruppo ossidrile nella componente fenolica (Ultee *et al.*, 2002). Come mostrato dalla caratterizzazione biochimica dell'olio di timo, infatti, i due componenti principali (timolo e carvacrolo) sono proprio dei monoterpeni che presentano il gruppo ossidrile, in posizione diversa, nella componente fenolica. Per contro, la posizione relativa del gruppo ossidrile non sembra influenzare in modo significativo il grado dell'attività antimicrobica (Ultee *et al.*, 2002).

È probabile che i componenti degli oli essenziali agiscano sulle proteine cellulari inserite nella membrana citoplasmatica (Burt, 2004). È noto che gli enzimi dell'ATP sintetasi, coinvolti nel trasporto attivo di ioni e molecole, sono situati nella membrana citoplasmatica associati a molecole lipidiche. Sono stati ipotizzati due possibili meccanismi dell'attività antimicrobica: le molecole idrocarburiche lipofile dei componenti degli oli essenziali possono accumularsi nel doppio strato fosfolipidico e distorcere l'interazione lipidi-proteine; oppure, possono verificarsi interazioni diverse della componente lipofila con le parti idrofobe delle proteine, destabilizzandole (Burt, 2004). La natura di questi meccanismi di azione spiega il perché gli oli essenziali siano spesso biocidi nei confronti di agenti patogeni così diversi.

## **Capitolo 5      Conclusioni**

Dai risultati ottenuti con le sperimentazioni descritte si può affermare che i diversi ammendanti influiscono positivamente non solo sui caratteri biometrici delle due officinali, ma anche e soprattutto sulla resa degli oli essenziali estratti.

La resa in olio è risultata superiore rispetto a quelle indicate dalla farmacopea ufficiale e rispetto a quelle riportate in sperimentazioni precedenti da altri autori nelle quali è stato impiegato soltanto concime minerale. In particolare, le rese più elevate sono state ottenute con l'impiego della farina di semi di *Brassica carinata*, sia per il timo che per l'origano. Tale incremento è dovuto molto probabilmente sia alla tossicità residua di tale farina, che ha stimolato il metabolismo secondario delle piante nei primi stadi di sviluppo, sia alla maggiore cessione di elementi nutritivi da parte dell'ammendante.

Sulla coltivazione in pieno campo di timo i diversi ammendanti, anche se non hanno particolarmente influenzato i caratteri biomorfologici delle piante, hanno invece influito sulla composizione chimica dell'olio. In particolare, la farina di semi di girasole ha incrementato sia la resa che l'attività antimicrobica dell'olio essenziale.

I test condotti con i ceppi PGPR/ISR hanno evidenziato come l'impiego di tali microrganismi possa influire positivamente sulle coltivazioni di timo e origano in coltura idroponica.

Il ceppo di *P. putida* CEPPO 16, ha incrementato, sulle piante di timo, la resa in olio e ha mostrato una maggiore attività nei confronti di funghi fitopatogeni.

Il ceppo di *B. cereus* 7III BAC, sulle piante di origano, ha influito positivamente sui parametri biomorfologici di tale coltura e ha permesso la produzione di un olio con una più spiccata attività antimicrobica.

La prova in campo condotta su timo inoculato con il ceppo di *P. putida* ha evidenziato come gli oli estratti dalle tesi "minerale 70" e "minerale 0", inoculate con il CEPPO 16, presentavano le rese di  $p$ -cimene e di  $\gamma$ -terpinene più alte rispetto agli altri trattamenti. Per contro, le suddette tesi hanno fornito le rese più

basse in timolo. Inoltre, l'attività battericida e fungicida è risultata simile per tutti i trattamenti.

I risultati ottenuti e evidenziano nel complesso, come sia possibile modulare la produzione quanti-qualitativa di oli essenziali ad azione biocida, mediante l'impiego di specifici ammendanti e batteri promotori della crescita/induttori di resistenza.



## **Capitolo 6      Bibliografia**

**AA.VV., 2001.** *Piccola guida alle erbe officinali: proprietà impieghi, notizie sulla coltivazione.* Agricoltura, supplemento 11:3.

**AA.VV., 2004.** *Flowering plants, dicotyledons: Lamiales.* J. W. Kaderet editore

**AA.VV., 2009.** *Piante officinali in Sicilia: Studio agronomico, fitochimico e farmacologico mirato alla loro valorizzazione e allo sfruttamento agro-industriale.* 17

**Abu Lafi S., Odeh I., Dewik H., Qabajah M., Hanus L. O., Dembitsky V. M., 2008.** Thymol and carvacrol production from leaves of wild Palestinian *Majorana syriaca*. *Bioresource technology* 99:3914-3918

**Adams R. P., 1995.** *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy.* Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois.

**Arshad M., Frankenberger W. P., 1993.** *Microbial Production of Plant Growth Regulators.* *Soil Microbial Ecology-Applications in Agricultural and Environmental Management*, Metting F. B., Marcel Dekker editor, 307-347.

**Banchio E., Bogino P. C., Santoro M., Torres L., 2010.** *Systemic Induction of Monoterpene Biosynthesis in *Origanum \_ majoricum* by Soil Bacteria* *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 10 (58):650–654

**Banchio E., Bogino P. C., Zygaldò J., Giordano W., 2008.** *Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L.* *Biochemical Systematics and Ecology*, 36:766–771

**Bauer K., D. Garbe and H. Surburg 2001.** *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses.* Wiley-VCH editore, 293.

- Ben Arfa, S. C., Preziosi-Belloy L., Gontard N., Chalier P.; 2005.** *Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical Structure.* Letters in Applied Microbiology, 43:49-154
- Bishop C. D., 1995.** *Antiviral activity of the essential oil of Melaleuca alternifolia (Maiden & Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus.* Journal of Essential Oil Research 7:641-644
- Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E., 2001.** *Production of plant secondary metabolites: a historical perspective.* Plant Science, 161:839-851.
- Boyle W., 1955.** *Spices and essential oils as preservatives.* American Perfum. Essent. Oil Review, 66: 25– 28.
- Burt S. A., 2004.** *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review.* International Journal of Food Microbiology. 94:223–253.
- Burt S. A., Reinders R. D., 2003.** *Antibacterial activity of selected plant essential oils against Escherichia coli O157:H7.* Letters in Applied Microbiology 36 (3):162-167.
- Canter P. H., Howard T., Edzard E., 2005.** *Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology.* Trends in Biotechnology vol. 23 (4):180-185
- Cantino P.D., 1990.** *The phylogenetic significance of stomata and trichomes in the Labiatae and Verbenaceae.* Journal of Arnold Arboretum, 71:323-370
- Cantino, P. D. 1992.** *Evidence for a polyphyletic origin of the Labiatae.* Ann. Missouri Bot. Gard. 79:361-379
- Carlton, R. R., Waterman P. G., Gray A. I., Stanley G. D., 1992.** *The antifungal activity of the leaf gland volatile oil of sweet gale (Myrica gale) (Myricaceae)* Chemoecology, 3:55-59

- Carson C.F. and Riley T.V., 1993.** *Antimicrobial activity of the essential oil of Melaleuca alternifolia.* Letters in Applied Microbiology, 16: 49-55.
- Carson C. F., Mee B. J., Riley T. V., 2002.** *Mechanism of action of Malaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46 (6):1914-1920.
- Catizone P., Marotti, M., Toderi G., Tètènyi P. 1986.** *Coltivazione delle piante medicinali e aromatiche.* Patron editore, 199-209.
- Copetta A., Lingua G., Berta G., 2006.** *Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in Ocimum basilicum L. var Genovese.* Mycorrhiza, 16:485-494.
- Cosentino S., Tuberoso C. I. G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F., 1999.** *In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils.* Letters in Applied Microbiology, 29, (2):130-135.
- Crecchio C., Gelsomino A., Ambrosoli R., Minati J. L., Ruggiero P., 2004.** *Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices.* Soil Biology and Biochemistry, 36 (11):1873-1883.
- Crosthwaite, D., 1998.** *UK trade within the flavour and fragrance industry.* International Federation of Essential Oils and Aroma Trades—21st International Conference on Essential Oils and Aroma's. IFEAT, London, 6-12
- D'Antuono L. F., Galletti G. C., Bocchini P., 2000.** *Variability of essential oil content and composition of Origanum vulgare L. populations from a North Mediterranean area (Liguria region, Northern Italy).* Annals of botany, 86:471-478

- Dafera D. J., Ziogas B. N., Polission M. G. 2003.** *The effectiveness of plant essential oils on the growth of Botrytis cinerea, Fusarium sp. and Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis.* Crop Protection, 22:39–44.
- De Maria G., 1992:** “*Le nostre erbe e piante medicinali*”, Fratelli Melita editori, 37-40
- Dorais M., Papadopoulos A. P., Luo X., Leonhart S., Gosselin A., Pedneault K., Angers P., Gaudreau L., 2001.** *Soilless greenhouse production of medicinal plants in North Eastern Canada.* Acta Horticultura, 554:297-303.
- Dorman H. J. D., Deans S. G., 2000.** *Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils.* Journal of Applied Microbiology 88:308-316.
- El-Ghandour I. A., Desouky E M., Galal Y. G. M., Arafa R. A., Abou Seer A. M. M., 2009.** Effect of biofertilizers and organic phosphorus amendments on growth and essential oil of marjoram (*Majorana hortensis L.*) Egyptian Academy Journal of Biology Sciences. 1 (1):29-36
- Faid M., Bakhy K., Anchad M., Tantaoui-Elaraki A., 1995.** *Alomond paste: Physicochemical and microbiological characterizations and preservation with sorbic acid and cinnamon.* Journal of Food Production, 58:547-550.
- Figueiredo A. C., Barroso J. G., Pedro L. G., Scheffer J. J. C., 1997.** *Physiological aspects of essential oil production.* Essential oils: Basic and applied research, Proceedings of the 27th international symposium on essential oils, Allured Publishing, Carol Stream: Franz, Ch., Máthé, Á. and Buchbauer, G., editors, 95-107
- Figueiredo C. A., Barroso J. Pedro L. G., Scheffer J. J.C., 2008.** *Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils.* Flavour and Fragrance Journal. 23(12): 213-226

- Gill A. O., Delaquis P., Russo P., and Holley R. A., 2002.** *Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham.* International Journal of Food Microbiology., 73: 83- 92.
- Giorgi A., Licheri G.L., Cocucci M., 2007.** *Influenza della nutrizione azotata sulla crescita e sul metabolismo secondario di Achillea millefolium L. ssp collina becker allevata in idroponica.* Colture artificiali di piante officinali: produzione di metaboliti secondari nelle piante medicinali in coltura artificiale, Aracne editore, 47-54
- Glenn W. T., Gershenzon J., Croteau R. B., 2000.** *Distribution of Peltate Glandular Trichomes on Developing Leaves of Peppermint.* Plant Physiology. 124 (2):655–664.
- Gontier E., Clement A., Tran T. L. M., Gravot A., Lievre K., Guckert A., Bourgaud F., 2002.** *Hydroponic combined with natural or forced root permeabilization: a promising technique for plant secondary metabolite production.* Plant Science, 163(4): 723- 732.
- Guenther E. 1948.** *The Essential Oils.* D. Van Nostrand editore
- Gupta, M. L., Prasad A., Ram M. Kumar S., 2002.** *Effect of the vesiculararbuscular mycorrhizal (VAM) fungus Glomus fasciculatum on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (Mentha arvensis) under field conditions.* Bioresource Technology, 8:77–79.
- Hallahan , D. L., 2000.** *Monoterpenoid biosynthesis in glandular trichomes of Labiatae plants.* Advances in Botanical research. Plant trichomes, academic press, 31:77-120
- Hornok L., 1988.** *Effect of environmental factors on the production of some essential oil plants.* Flavor and fragrances: A World Perspective. Lawrence, Mookherjee, Willis editori, 129-140
- ISMEA, 1994:** “*Piante officinali-Rapporto 1993*”

- Juliano C., Mattana A., Usai M., 2000.** *Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of Thymus herba-barona Loisel growing wild in Sardinia.* Journal of Essential Oil Research 12:512-522.
- Karpouhtsis I., Pardali E., Feggou E., Kokkini S., Scouras Z. G., Mavragani-Tsipidou P., 1998.** *Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils.* Journal of Agriculture Food Chemistry 46:1111-1115
- Karlowsky P 2008.** *Secondary metabolites in soil ecology.* Soil biology, 1:1-3
- Karousou R., Vokou D., Kokkini S. 1998.** *Distribution and essential oils of Salvia pomifera subsp. pomifera (Labiatae) on the island of Crete (S Greece).* Biochemical Systematics and Ecology 26: 89-897
- Khaosaad T., Vierheilig H., Nell M., Zitterl-Eglseer K., Novak J., 2006.** *Arbuscular mycorrhiza alters the concentration of essential oils in oregano (Origanum sp., Lamiaceae).* Mycorrhiza, 16:443-446.
- Kloepper J. W., Leong J., Teinze M., Schroth M. N., 1980.** *Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting Rhizobacteria.* Nature 286:885-886.
- Kloepper J. W., 1993.** *Plant Growth promoting rhizobacteria as Biological Control Agents.* Soil Microbial Ecology-Applications in Agricultural and Environmental Management, Metting F. B., Marcel Dekker editor, 255-274.
- Kokkini S., Vokou D., 1993.** *The hybrid Origanum × intercedens from the island of nisyros (SE Greece) and its parental taxa; comparative study of essential oils and distribution.* Biochemical Systematics and Ecology, 21, (3):397-403
- Kokkini S., 1997.** *Taxonomy, diversity and distribution of Origanum species. Oregano.* Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, 8-12 may 1996, Valenzano (Bari), Italy. 2-12, Padulosi S. editor.
- Lambert R. J. W., Skandamis P.N., Coote P., Nychas G. J. E., 2001.** *A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol.* Journal of Applied Microbiology 91:453-462.

- Lazzeri L., Curto G., Malaguti L., 2007.** *Controllo dei patogeni infestanti nei sistemi biologici- Biofumigazione.* Bioagricoltura 106: 4-6.
- Maffei M., 1999.** *Metabolismo e prodotti secondari delle piante*, UTET editore
- Mahmoud S. S., Croteau R. B., 2001.** *Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase.* Proceedings of the National Academy of the Sciences U S A, 31,98 (16):8925-8927.
- Maleci Bini L. e Giuliani, C., 2006.** *The glandular trichomes of the labiatae. a review.* Acta Horticulture (ISHS), 723:85-90.
- Martinetti L., Quattrini E., Bononi M., Tateo F., 2006.** Effect of the mineral fertilization on the yield and the oil content of two cultivars of. Acta Horticulture. (ISHS) 723:399-404
- Meyer J. R. and Linderman R. G., 1986.** *Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, Pseudomonas putida* Soil Biology and Biochemistry 18 (2):185-190
- Miguel G., Simoes M., Figueiredo A. C., Barroso J. G., Pedro L. G., Carvalho L., 2004.** *Composition and antioxidant activities of the essential oils of Thymus caespitius, Thymus camphoratus and Thymus mastichina.* Food Chemistry 86:183–188
- Mourey A., N. Canillac 2002.** *Anti-Listeria monocytogenes activity of essential oils components of conifers.* Food Control 13:289–292
- Novak J., Draxler L., Gohler I., Franz C. M., 2005.** *Essential oil composition of Vitex agnus-castus - Comparison of accessions and different plant organs.* Flavour and Fragrance journal, 20 (2):186-192
- Pace L., Pacioni G., Spano' L., Marotti M., Grandi S, Piccaglia R., 2007.** *Colture artificiali di piante medicinali: Artemisia petrosa subsp. eriantha (genepi appenninico).* Colture artificiali di piante officinali: produzione di

metaboliti secondari nelle piante medicinali in coltura artificiale, Aracne editore, 233-239

**Pacifici S., Tozzini L., Maggini R., Pardossi A., Tognoni F., 2007.** *La coltivazione idroponica delle piante medicinali: il caso dell'Echinacea angustifolia*. Colture artificiali di piante officinali: produzione di metaboliti secondari nelle piante medicinali in coltura artificiale, Aracne editore, 21-36

**Pessoa L. M., Morais S. M., Bevilaqua C. M. L. and Luciano J. H. S., 2002.** *Anthelmintic activity of essential oil of Ocimum gratissimum Linn. and eugenol against Haemonchus contortus*. Veterinary Parasitology, 109, (16):59-63.

**Pichersky, G., 2000.** *Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective*, Trends in plant sciences, 5 (10):439-445

**Pignatti S., 1982.** *Flora d'Italia* Edagricole vol 3

**Roberts M., F., and Wink M., 1998.** *Alkaloids: biochemistry ecology and medicinal application*. Plenum, New York, 1486 pp, Chapter Introduction, 1-7

**Russo M., Galletti G. C., Bocchini P., Carnacini A., 1988.** *Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (Origanum vulgare ssp. hirtum (Link) Iestwaart): a preliminar evaluation of their use in chemotaxonomy by Cluster Analysis. 1. Inflorescences*, Journal agriculture food chemistry, vol. 46, (9):3741 – 3746,

**Shaw D., Annett J. M., Doherty B., Leslie J. C., 2007.** *Anxiolytic effects of lavender oil inhalation on open-field behaviour in rats*. Phytomedicine, 14 (9):613-620

**Strasburger E., 2007.** *Trattato di Botanica*. Antonio Delfino editore, 2:850

**Sylvestre M., Pichette A., Longtin A., Nagau F., Legault J., 2006.** *Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of Croton flavens L. from Guadeloupe*. Journal of Ethnopharmacology , 103:99-102



- Tepe B, Daferera D, Sokmen M, Polissiou M, Sokmen A: 2004.** *In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of Thymus eigii M. Zohary et P.H. Davis.* Journal of Agriculture Food Chemistry , 52:1132-1137
- Theis N. and Lerdau M., 2003.** *The evolution of function in plant secondary metabolites.* International Journal of Plant Science, 164 (3):93-102
- Tutin T. G., Burges N. A., Chater A. O., Edmondson J. R., Heywood V. H., Moore D. M., 1993.** *Flora Europaea*, Cambridge University Press vol. 1
- Ultee A., Kets E. P. W., Alberda M., Hoekstra F. A., and Smith E. J., 2000.** *Adaptation of the food-borne pathogen Bacillus cereus to carvacrol.* Archives of Microbiology, 174:233-238
- Uta Von Rad, Muller M J., Durner J., 2005.** *Evaluation of natural and synthetic stimulants of plants immunity by microarray technology.* New Phytologist. 165:191-202
- Van Loon L. C., 2007.** *Plant response to plant growth-promoting rhizobacteria.* Eur. Journal of . Plant Pathology, 119:243-254.
- Vessey, K. J. 2003.** *Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers.* Plant Soil, 255: 571-586.
- Vokou D., Kokkini S., Bessiere J.M., 1988.** *Origanum onites (Labiatae) in Greece: Distribution, volatile oil yield, and composition.* Economic Botany, 42 (3):407-412.
- Werker, E., 2000.** *Trichomes diversity and development.* Advances in Botanical research. Plant trichomes, academic press, 31:1-35
- Zaccardelli M., Iovenio P., Leone A., De Nicola F., Campanile F., Del Galdo A., Alfani A., 2005.** *Approccio olistico nella valutazione dell'effetto di elevate dosi di compost da F.O.R.S.U. sulla biomassa microbica di un suolo agrario.* Convegno Nazionale SISS "Il suolo: sistema centrale nell'ambiente e nell'agricoltura" Bari, 21-24 Giugno: 120.

**Zaccardelli M., Malzone A., De Nicola F., Alfani A., 2006.** *Densità di popolazione di alcune comunità microbiche in un terreno agrario ammendato con dosi crescenti di compost da F.O.R.S.U. e valutazione dell'antibiosi dovuta ai batteri sporigeni.* Convegno "Utilizzo del compost, Napoli 30 novembre 2006

**Zaccardelli M., Villecco D. , Del Galdo A., Lazzeri L., 2007.** *Toxic effects of Brassica carinata meal on phytopathogenic and useful bacteria.* Agroindustria, 6:70.

**Zobayed S. M. A., Saxena P. K. 2004.** *Production of St. John's wort plants under controlled environment for maximizing biomass and secondary metabolites.* In Vitro Cellular and Development Biology-Plant 40:108-114

**Zaccardelli M., , Pentangelo A., D'Onofrio B., Marchetti R., 2008.** *Use of Defatted Seed Meals of Helianthus annuus L. and Brassica carinata A. Braun as Amendments on Escarole Endive* X Congress of ESA European Society for Agronomy University of Bologna - Italy September 15-19, 2008